

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

***Pseudomonas putida* pseudouridiini süntaas RluA**

Bakalaureusetöö

Lõputöö maht (12 EAP)

Aneth Lvovs

Juhendajad MSc Mari Tagel

PhD Heili Ilves

TARTU 2017

Infoleht

***Pseudomonas putida* pseudouridiini süntaas RluA**

RNA modifitseerimine on universaalne ja konserveerunud protsess. Erinevad modifikatsioonid stabiliseerivad RNA struktuuri, suurendavad translatsiooni efektiivsust ja täpsust ning võimaldavad isegi alternatiivset koodonkasutust. Kõige sagedasem RNA modifikatsioon on pseudouridiin. Meie laboris on varasemalt leitud seos tRNA antikoodoni läheduses paiknevate pseudouridiinide ja mutatsioonisageduse vahel bakteris *Pseudomonas putida*. RluA on pseudouridiini süntaas, mis sünteesib pseudouridiine rRNA-sse ning tRNA antikoodoni lähedusse. Käesolevas töös uurisime RluA sünteesitavate pseudouridiinide seost mutatsioonisagedusega *Pseudomonas putida*.

Märksõnad: *rluA*, pseudouridiin, RNA modifikatsioonid, mutatsioonisagedus, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Pseudouridine synthase RluA of *Pseudomonas putida*

Modifying RNA is a universally conserved process. Different modifications stabilise the structure of RNAs, increase the effectiveness and fidelity of translation and even enable alternative codon usage. Pseudouridines are the most abundant RNA modifications. Previously it has been shown in our workgroup, that there is a link between the mutation rate of *Pseudomonas putida* and pseudouridines located near the anticodon region of tRNAs. In this paper we research the connection between pseudouridines synthesised by RluA and the mutation rate of *Pseudomonas putida*.

Keywords: *rluA*, pseudouridine, RNA modifications, mutation rate, *Pseudomonas putida*

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	3
Kasutatud lühendid.....	6
Sissejuhatus	7
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1 RNA modifikatsioonid	8
1.1.1 RNA modifikatsioonide olulisus	11
1.1.2 Modifitseeritud nukleotiidide seos mutatsioonisagedusega bakterirakkudes	11
1.2 Pseudouridiinid.....	12
1.2.1 Pseudouridiini süntaasid.....	13
1.2.2 Pseudouridiinide esinemine bakterites	15
1.2.3 Pseudouridiinide bioloogiline olulisus	16
1.3 Pseudouridiini süntaas RluA	18
1.3.1 RluA struktuur.....	18
1.3.2 RluA kahetine substraadispetiifilisus ja äratundmisreaktsiooni mehhanism	19
2. Eksperimentaalne osa	21
2.1 Töö eesmärgid	21
2.2 Materjalid ja meetodika.....	22
2.2.1 Kasutatud söötmed, tüved ja plasmiidid.....	22
2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon	24
2.2.3 PCR	24
2.2.4 Plasmidi eraldamine ja restriksioonianalüüs	26
2.2.5 Geelelektroforees.....	26
2.2.6 Kloonimine	26
2.2.7 $\Delta rluA$ tüvede konstrueerimine	27
2.2.8 Sekveneerimine	28
2.2.9 Rif ^R mutantide tekkesageduse leidmine Rif ^R / <i>rpoB</i> testsüsteemiga	28
2.2.10 Phe ⁺ mutantide tekkesageduse leidmine plasmidse TAG testsüsteemiga.....	29
2.2.11 Kasvukõverad ja generatsiooniaeg	30

2.2.12	Bioinformaatiline analüüs	30
2.2.13	Statistiline analüüs.....	30
2.3	Tulemused ja arutelu	31
2.3.1	<i>P. putida</i> RluA substraatide virtuaalne analüüs.....	31
2.3.2	Pseudouridiini süntaasi RluA mõju <i>P. putida</i> eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude mutatsioonisagedusele.....	31
2.3.3	RluA mõju <i>P. putida</i> statsionaarse kasvufaasi rakkude mutatsioonisagedusele	33
2.3.4	<i>P. putida</i> Δ rluA <i>tac-rluA</i> komplementatsioonitüvi ja RluA aktiivtsentri mutant	35
2.3.5	RluA puudumise mõju <i>P. putida</i> rakkude kasvukiirusele	36
	Kokkuvõte	38
	Summary	39
	Tänuõnad	40
	Kasutatud kirjandus	41
	Kasutatud veebiaadressid	47

Kasutatud lühendid

Amp – ampitsilliin

ASL – antikoodon-õlg-ling (ingl k – *anticodon-stem-loop*)

Bp – bensüülpenitsilliin

CAA – kaseiini hüdroolüsaat (ingl k – *casamino acids*)

CFU – kolooniat moodustav ühik (ingl k – *colony forming unit*)

Glc – glükoos (ingl k – *glucose*)

Km – kanamütsiin

LB – lüsogeenne sööde (ingl k – *lysogeny broth*)

Phe – fenool

Rif – rifampitsiin

Ψ – pseudouridiin

wt – metsiktüvi (ingl k – *wild-type*)

Sissejuhatus

Erinevalt DNA-st, mis täidab rakkudes enamasti geneetilise informatsiooni säilitaja rolli, on RNA-st koosnevatel struktuuridel mitmeid erinevaid ülesandeid. Selleks, et RNA molekulid saaksid oma rolle spetsiifiliselt täita, on nende nukleotiidses järjestuses hulgaliselt modifitseeritud nukleotiide. Modifikatsioonid esineb pea igat tüüpi RNA-des. Erinevad modifitseeritud nukleotiidid stabiliseerivad RNA struktuuri ning suurendavad RNA molekuli funktsionaalsete rollide täitmise efektiivsust.

Pseudouridiinid on kõige levinumad modifikatsioonid RNA-s. Pseudouridiin sünteesivad spetsiaalsed ensüümid – pseudouridiini süntaasid. Bakteritel on üks pseudouridiinide süntaas RluA, mis on eriline, kuna see sünteesib pseudouridiini nii ribosomaalsesse RNA-sse (rRNA) kui ka transpordi RNA-sse (tRNA).

Meie laboris uuritakse RNA modifikatsioonide seost mutatsioonidega *Pseudomonas putida* bakterirakkudes. Mutatsioonisagedust mõjutavate faktorite uurimine aitab paremini mõista bakterite evolutsioneerumise aluseid. Käesoleva töö eesmärgiks oli väljaselgitada RluA sünteesitud pseudouridiinide seos *P. putida* mutatsioonisagedusega.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 RNA modifikatsioonid

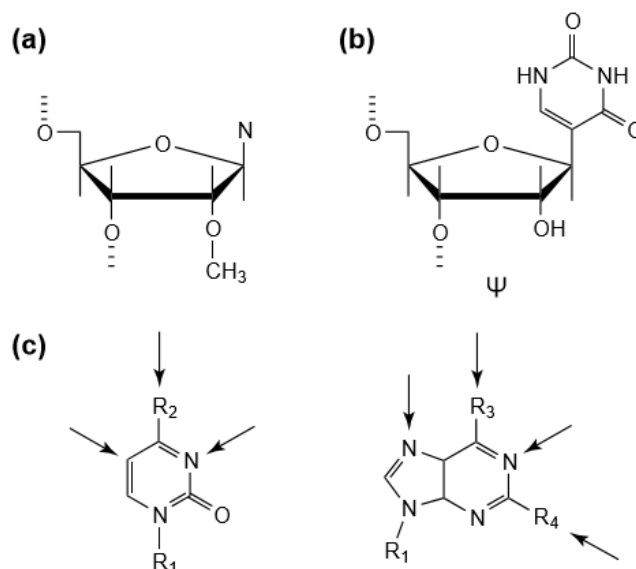
RNA molekulide modifitseerimine on evolutsiooniliselt konserveerunud protsess, toimudes kõigis elusorganismides (Sun jt., 2015). Kui DNA-s on erinevaid modifikatsioone kirjeldatud ligikaudu 20 (Sood jt., 2016), siis RNA-s on leitud rohkem kui 100 erinevat modifikatsiooni (Sun jt., 2015). Põhjus, miks RNA-s on palju rohkem modifikatsioone peitub selles, et erinevat tüüpi RNA-del on rohkem ülesandeid. RNA-del võib olla struktuurne, katalüütiline või regulatoorne roll ning lisaks on RNA-d olulised komponendid translatsioonil. Modifikatsioonide suur mitmekesisus võimaldab erinevatel RNA-del interakteeruda väga spetsiifiliselt ka näiteks DNA ja valkudega. DNA on põhiliselt vaid geneetilise informatsiooni säilitaja. (Li ja Mason, 2014) Modifitseeritud nukleotide leidub nii rRNA-s, tRNA-s, informatsiooni RNA-s (mRNA) kui ka väikeses tuuma RNA-s (snRNA), väikeses tuumakese RNA-s (snoRNA), väikeses interfereerivas RNA-s (siRNA) ning Piwidega interakteeruvast RNA-s (piRNA). (Machnicka jt., 2012)

RNA modifikatsioonide avastamise algusaegadel arvati, et modifitseeritud nukleotide lisatakse transkriptsiooni käigus RNA ahelasse. Mõned aastad hiljem avastasid sõltumatult Svenssoni töögrupp (Svensson jt., 1963) ning Fleissner ja Borek (Fleissner ja Borek, 1962), et nukleotide metüleeritakse alles primaarses transkriptis. Tänapäevaks on teada, et enamik modifitseeritsioone sünteesitakse samuti RNA ahela siseselt. Siiski algab osade modifikatsioonide biosüntees väljaspool RNA ahelat. Näiteks algab queuosiini biosüntees sellest, kui vaba guanosiintrifosfaat modifitseeritakse 7-tsüano-7-deatsaguanosiiniks, mis omakorda modifitseeritakse 7-aminometüül-7-deatsaguanosiiniks. Alles see struktuur viiakse RNA ahelasse. Selleks toimub transglükosülatsiooni reaktsioon, kus tavaline guaniin asendatakse 7-aminometüül-7-deatsaguanosiiniga. (Iwata-Reuyl, 2008) RNA ahelas lisandub sellele struktuurile tsüklopentandiool ning see kokku ongi queuosiin (Frey jt., 1988, Iwata-Reuyl, 2003). Lisaks kõiksugu erinevatele RNA modifikatsioonidele on olemas hüpermodifikatsioonid, mille heaks näiteks on samuti queuosiin. Hüpermodifitseeritud nukleotiidid, on sellised, mille täielikuks modifitseerimiseks viiakse läbi kaks või rohkem erinevat modifitseerimisreaktsiooni üksteise järel (Machnicka jt., 2012).

Enamik modifitseeritud nukleotide on spetsiifilised bakteritele, arhedele, eukarüootidele või isegi individuaalselt mõnele liigile. Samas on osad modifikatsioonid tekkinud juba enne bakterite, arhede ja eukarüootide lahknemist, näiteks pseudouridiinid (Ψ). Seetõttu on olemas

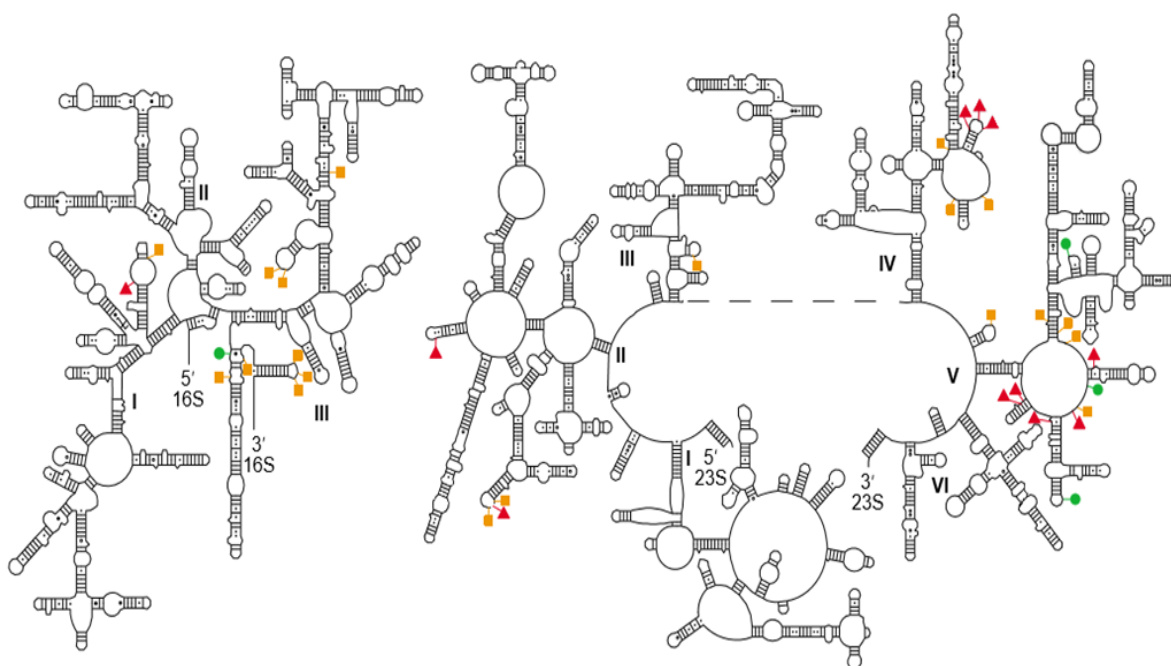
Ψ -sid erinevates RNA molekulides, mille positsioonid on identsed nii bakterite, arhede kui ka eukarüootide seas. (Björk ja Hagervall, 2014)

rRNA-s on kolme tüüpi modifikatsioone: Ψ -d, riboosi 2'OH metülatsioonid ja lämmastikualuste metüleerimised (Joonis 1). *Escherichia coli* ribosoomis on 10 Ψ -d, 4 2'OH metülatsiooni ja 19 erinevat lämmastikaluste metülatsiooni (Joonis 2). (Decatur ja Fournier, 2002)



Joonis 1. Modifikatsioonid rRNA-s. (a) tähistab 2'OH metülatsioone. (b) tähistab pseudouridiine. (c) nooltega on tähistatud potentsiaalsed lämmastikaluste metüleerimispositsioonid. (Decatur ja Fournier, 2002, muudetud)

E. coli väikeses subühikus asub suur hulk modifikatsioone sellistes piirkondades, kus tekivad ühendused ribosoomi subühikute vahele. Lisaks on väikeses subühikus palju modifikatsioone A, P ja E saitides, kus toimuvad interaktsioonid tRNA-dega. 75% kõigist *E. coli* ribosoomi suure subühiku rRNA modifikatsioonidest asuvad polüpeptiidi väljumistunneli ja peptidüültransferaasse tsentri läheduses (joonis 2). (Decatur ja Fournier, 2002)



Joonis 2. Modifikatsioonid *E. coli* ribosoomi rRNA-s. Vasakul on 16S ja paremal 23S rRNA. Punased kolmnurgad tähistavad Ψ-sid, rohelised ringid 2'-OH-metülatsoone ja oranžid ruudud lämmastikaluste metülatsoone. (Decatur ja Fournier, 2002)

Bakterite tRNA nukleotiididest on umbes 10% modifitseeritud. *E. colis* on 47 erinevat tRNA-d, mille kodeerimiseks on olemas 86 geeni. Need geenid moodustavad *E. coli* genoomist 0,26-0,28%. Samas hõlmavad tRNA modifikatsioone läbiviivate ensüümide geenid ligi 1,3% genoomist. Selline protsentide vahetegur võiks viidata, kui olulised on tRNA modifikatsioonid bakteritele. (Björk ja Hagervall, 2014)

E. colis on lämmastikualuste modifitseerimiseks kindlad ensüümid. Iga ensüüm modifitseerib mõnda spetsiifilist nukleotiidi, mida leidub üksikutes positsioonides. Samal ajal on eukarüootidel ja arhedel RNA modifitseerimiseks snoRNA-alk kompleksid (snoRNP), milles tuntakse modifitseerimiskohad ära RNA-ga ning modifitseerimisreaktsiooni viib läbi valguline pool. Erinevate viiside väljakujunemine samade modifikatsioonide sünteesimiseks näitab samuti, et RNA modifitseerimine on elusorganismidele oluline. (Decatur ja Fournier, 2002)

Kuigi *E. colis* on erinevaid modifikatsioone tRNA-s vaid 33, on nende modifikatsioonide sünteesimiseks vaja vähemalt 62 erinevat ensüümi. Mõnda modifikatsiooni on vaid ühes tRNA-s, aga selliste modifikatsioonide tegemiseks võivad korraga töötada ka mitu ensüümi. Enamus modifikatsioone on siiski sellised, mida leidub mitmes erinevas tRNA-s ja isegi ühe tRNA siseselt mitmes positsioonis, näiteks Ψ. (Björk ja Hagervall, 2014)

1.1.1 RNA modifikatsioonide olulisus

Modifitseeritud nukleotiididel on muutunud steerilised omadused, lokaalne lämmastikaluste stäkkumine ning potentsiaalsete vesiniksidemete moodustumise hulk (Arnez ja Steitz, 1994, Davis, 1995). Modifikatsioonide tõttu tekivad muutused rRNA ja tRNA struktuurides, mis omakorda võivad mõjutada valkude translatsiooni. Modifitseeritud nukleotiidid mRNA-s võivad samuti selles lokaalselt stabiilsust suurendada. (Bykhovskaya jt., 2004) Modifitseeritud nukleotiidid võivad põhjustada ka ebatraditsioonilist koodonite tõlgendamist. Näiteks mRNA adeniinide ja tsütosiinide deamineerimise tagajärjel võib tRNA lugeda neid mõne teise nukleotiidina. (Maas ja Rich, 2000).

Varasemalt on sünteesitud *in vitro* *E. coli* 30S ribosoomi subühik, kust puudusid kõik normaalsel ribosoomil esinevad modifikatsioonid. Tulemused näitasid, et 16S rRNA-s pole üksi modifikatsioon hädavajalik interakteerumiseks tRNA-ga, A, P ja E saidi funktsionaalsuseks ega ribosoomi kokkupanekuks. (Krzyszosiak jt., 1987) Ribosomaalsete Ψ-de puudumisel väheneb rakkude kasvukiirus ning koos metsiktüve (*wt*) rakkudega on valik Ψ-deta ribosoomide vastu (Krzyszosiak jt., 1987, Raychaudhuri jt., 1999).

Modifitseeritud nukleotiidide olemasolu tRNA-s suurendab koodon-antikoodon interaktsiooni korrektsust ning translatsiooni efektiivsust ja täpsust (Harrington jt., 1993). Suurema osa modifikatsioonide puudumisel, ei vähene tRNA-de võime aminohappeid kanda (Hall jt., 1989). Modifitseerimata nukleotiididel on teistsugune konformatsioon ja seetõttu muutub modifitseerimata nukleotiididega tRNA-de aminoatsüleerimise kineetika (Sampson ja Uhlenbeck, 1988). Kui tRNA-del on modifitseerimata nukleotiidid positsioonides 34 ja 37 (joonis 7), siis tekivad aminoatsüleerimisreaktsioonis probleemid õigete aminohapte väljavalimisega (Hall jt., 1989). tRNA modifikatsioonid võivad mõjutada ka õige lugemisraami hoidmist. 1-metüülguanosiin asub antikoodoni kõrval 37. positsioonis sellistes tRNA-des, mis loevad C nukleotiidiga algavaid koodoneid. Selle modifikatsiooni puudumisel *Salmonella typhimurium*il võib indutseerida raaminihke teket. (Björk jt., 1989)

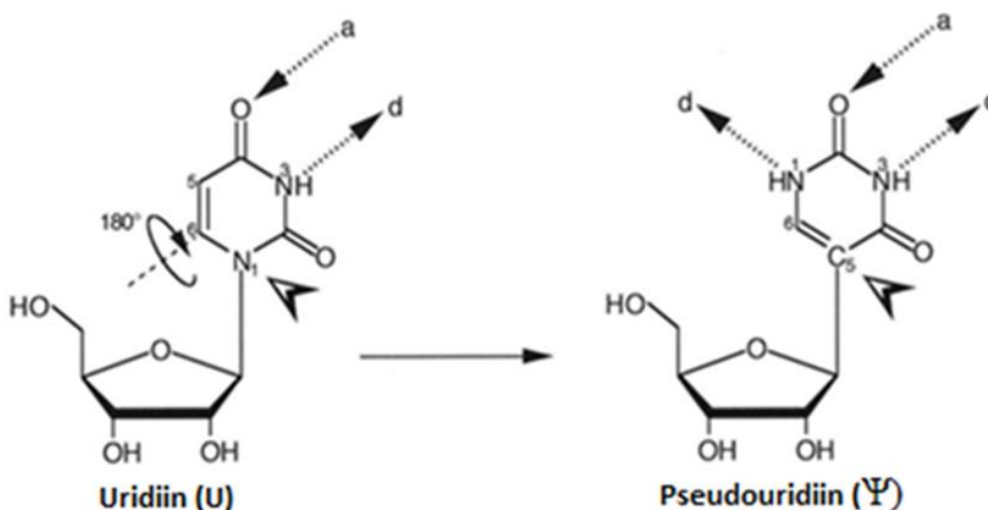
1.1.2 Modifitseeritud nukleotiidide seos mutatsioonisagedusega bakterirakkudes

Mutatsioonid on muutused DNA nukleotiidses järjestuses, mis fikseeruvad raku jagunemisel. RNA modifikatsioonidel on leitud seos mutatsioonisagedusega bakteri rakkudes. Näiteks on leitud selline ensüüm nagu MiaA, mis modifitseerib tRNA-s 37. adeniini, lisades sellele 7. lämmastiku külge isopentüülühikut. Pärast modifitseerimist sünteesivad nukleotiidi edasi MiaB

ja võib olla ka MiaC, mille tulemusel saadakse adeniinist hüpermodifitseeritud $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$. Kui muteerida *E. coli* *miaA* geen nii, et MiaA enam adeniini ei modifitseeri, siis jäävad tegemata ka järgnevad modifikatsioonid. Modifitseerimata nukleotiidi puhul tekib aga mutaatorfenotüüp, milles on suurenenud ligi neli korda transversioonide tase. (Zhao jt., 2001) Meie laboris loodi uudne testsüsteem, et otsida uusi mutatsioonisagedust mõjutavaid geene *P. putida* genoomist ja selles uuringus leiti, et *truA* defektsus suurendab mutatsioonisagedust *P. putida* rakkudes eksponentsiaalses kasvufaasis ligikaudu neli korda. (Tagel jt., 2016) TruA on pseudouridiini süntaas, mis modifitseerib tRNA-s uridiine positsioonides 38-40 (Kammen jt., 1988).

1.2 Pseudouridiinid

Pseudouridiin on uridiini 5-ribosüül isomeer (joonis 4). Selle avastasid 1957. aastal eraldiseisvalt Cohn ning Davis ja Allen (Cohn, 1957, Davis ja Allen, 1957). Ψ sünteesitakse RNA ahela koosseisu kuuluvast uridiinist (Johnson ja Söll, 1970). Ψ -sid leidub nii eukarüootides, arhedes kui ka bakterites, bakteritel leidub näiteks rRNA-des ja tRNA-des (Charette ja Gray, 2000). Ψ -sid on RNA-s rohkem kui ühtegi teist modifikatsiooni ja seetõttu kutsutakse seda isegi „viieandaks nukleosiidiks” (Davis ja Allen, 1957).

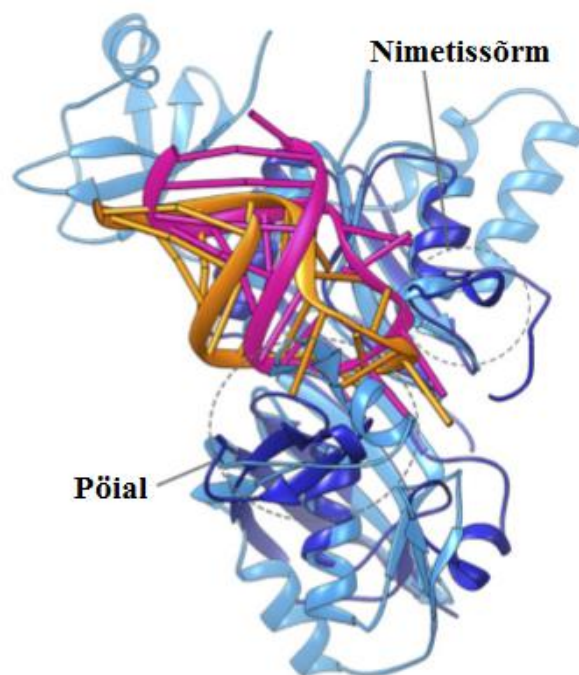


Joonis 4. Uridiini isomerisatsioon Ψ -ks. Valged nooled näitavad, millise uratsiili aatomiga suhkur uridiinis ja Ψ -s seondub. Isomeriseerumine toimub, kui uratsiili lämmastikalust pööratakse 180° ümber selle N3-C6 telje (telge märgib katkendlik joon). Ψ -l on üks vesiniksideme doonor rohkem kui uridiinil (aktseptor ja doonor on märgitud tähtedega a ja d). (Charette ja Gray, 2000, muudetud)

1.2.1 Pseudouridiini süntaasid

Pseudouridiine sünteesivad spetsiaalsed ensüümid – pseudouridiini süntaasid (Ψ süntaasid). Nii bakterite, arhede kui ka eukarüootide Ψ süntaasid jaotatakse viieks perekonnaks: RluA, RsuA, TruA, TruB ja TruD. Osad süntaasid isomeriseerivad uridiine vaid ühes positsioonis ja ühte tüüpi RNA-s. Näiteks RsuA, mis isomeriseerib vaid 16S rRNA-s 516. positsioonis asuvat uridiini (Conrad jt., 1999). Lisaks on sellised süntaasid, mis isomeriseerivad uridiine sarnastes RNA-des samades positsioonides. Näiteks TruB, mis isomeriseerib kõigis erinevates tRNA-des 55. uridiini tRNA T Ψ C õlas (Hoang ja Ferré-D'Amaré, 2001). Veel on olemas sellised süntaasid, mis isomeriseerivad uridiine erinevates RNA-des kohtades, kus on sarnane järjestus ja struktuur. Näiteks RluA, mis modifitseerib nii tRNA-d kui ka rRNA-d (Raychaudhuri jt., 1999). Lisaks on sellised Ψ süntaasid nagu TruA (Kammen jt., 1988) ja RluD (Del Campo jt., 2004), mis modifitseerivad sama RNA siseselt mitut lähestikuses positsioonis asuvat uridiini.

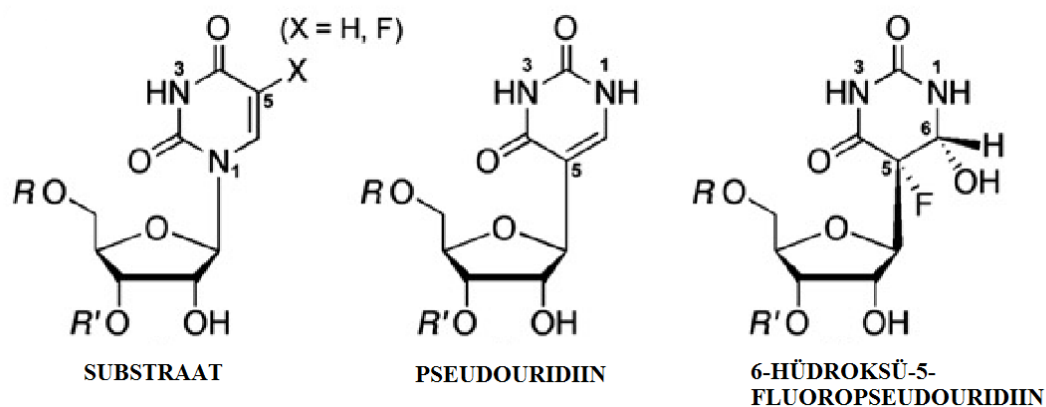
Erinevate perekondade Ψ süntaasidel on erinev aminohappeline järjestus, aga nende südamikustruktuur voltub sarnaselt. Kõigil Ψ süntaasidel asub südamikus konserveerunud aspargiinhappejääk, mis on katalüütiliseks aktiivsuseks asendamatu. Südamikku võib ümbritseda kuni kaks perifeerset struktuurset elementi, nn nimetissõrme ja pöidla struktuur mille abil tunneb süntaas substraadi spetsiifiliselt ära ning viib läbi pseudouridiini sünteesi. Näiteks TruB-l on substraadi sidumiseks olemas „pöidla” struktuur (joonis 5) (Hoang ja Ferré-D'Amaré, 2001). RsuA-l on jällegi olemas „nimetissõrme” struktuur, aga puudub „pöidla” struktuur (Sivaraman jt., 2002). Mõlemad struktuursed elemendid on olemas RluA-l (joonis 5), RluC-l, RluD-l ja TruA-l. Kuigi Ψ süntaasid erinevad nii järjestuse kui ka perifeersete struktuursete elementide poolest, on neil siiski sarnane südamik, mis viitab ühele ühisele eellasensensüümile. (Hoang jt., 2006)



Joonis 5. RluA ja TruB struktuur seotuna substraat RNA-ga. RluA ja tRNA antikoodon-õlg-ling (tumesinise ja oranžiga) ning TruB T-õlg-lingu (helesinise ja roosaga) kujutis. Nimetissõrme ja pöidla domäänid on ümbritsetud halli punktiirjoonest ringiga. (Hamma ja Ferré-D'Amaré, 2006, muudetud)

Ψ sünteesimiseks pole vaja kofaktoreid (Lane jt., 1995). Ψ süntaasid tunnevad substraati spetsiifiliselt ära järjestuse või struktuuri alusel (Hamma ja Ferré-D'Amaré, 2006). Lisaks on Ψ süntaasid võimelised *in vitro* ära tundma ka 5-fluorouridiini. Viimase isomerisatsiooni tulemusel tekib 6-hüdrosü-5-fluoropseudouridiin (joonis 6) (Hoang jt., 2006). RluA moodustab 5-fluorouridiiniga kovalentse kompleksi, mis ei lase süntaasil vabaneda (Spedaliere ja Mueller, 2004).

Süntaaside konserveerunud katalüütiline aspargiinhappejääk kutsub esile nukleofiilse rünnaku uratsiili kuuendale süsinikule. Nukleofiilne rünnak lõhub N-C glükosiidse sideme. Riboosist vabanenud lämmastikalus, olles seotud katalüütilise aspargiinhappejäägi kõrvalahelaga, keeratakse 180° ümber C6-N3 telje. Seejärel ühendatakse lämmastikalus uuesti riboosiga ja nii moodustub C-C glükosiidne side, millele järgneb lämmastikaluse vabanemine süntaasist (joonis 4). (Charette ja Gray, 2000)

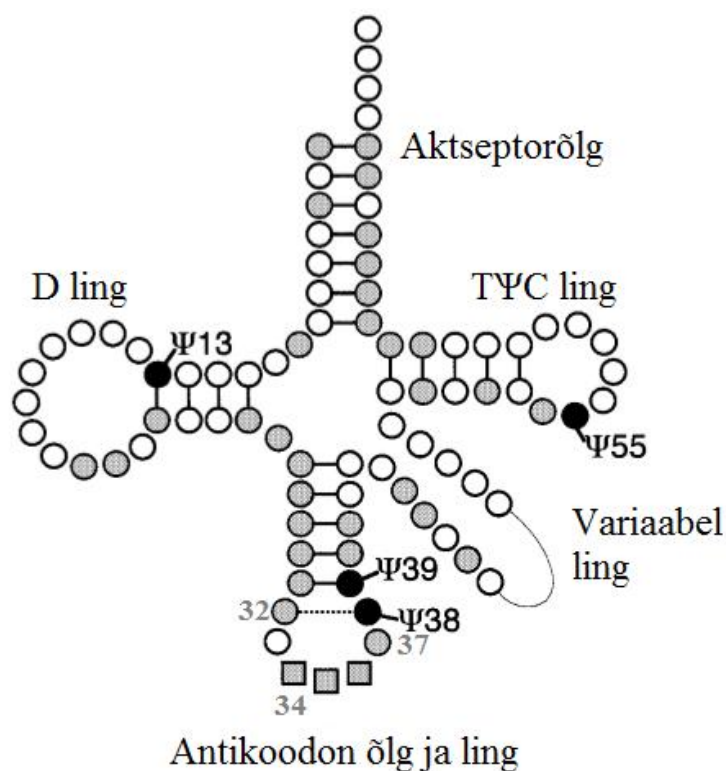


Joonis 6. Ψ süntaaside substraadid ja produktid. Ψ süntaaside substraadiks võib olla uridiin või 5-fluorouridiin (kui X-i asemel on H, on tegemist uridiiniga ning kui X-i asemel on F, on tegemist 5-fluorouridiiniga.). Vastavalt substraadile on produktiks esimesel juhul Ψ ning teisel juhul 6-hüdroksü-5-fluoropseudouridiin. (Hoang jt., 2006, muudetud)

1.2.2 Pseudouridiinide esinemine bakterites

Pseudouridiine leidub bakteritel nii tRNA-s (Björk ja Hagervall, 2014) kui ka rRNA-s (Decatur ja Fournier, 2002). Ribosoomis on Ψ-sid nii suure kui ka väikese subühiku rRNA-s. *E. coli*l on ribosoomi 16S rRNA-s üks ja 23S rRNA-s kümme Ψ-d (joonis 2) (Decatur ja Fournier, 2002). Ribosoomi suuremas subühikus moodustavad Ψ-d kolm selgesti eristatavat klastrit subühiku II, IV ja V domäänis. Sekundaarstruktuurist vaadatuna paistavad need klastrid üksteisest kaugel, kuid tertsiaalstruktuuris koonduvad kõik peptidüültransferaasse tsentri lähedusse. Selline paigutus viitab, et Ψ-d on olulised ribosoomi funktsionaalsuseks, kuna peptidüültransferaases tsentris toimuvad olulised interaktsioonid rRNA, mRNA ja tRNA antikoodonlingu vahel. (Brimacombe jt., 1993)

Ψ-sid leidub palju ka tRNA-s. Osad Ψ-de positsioonid tRNA-s on konserveernud nii bakterite, arhede kui ka eukarüootide seas. Näiteks tRNA T-õla Ψ55, mille järgi nimetatakse seda tRNA õlga ka TΨC; D-õlas Ψ13, mis hoiab lokaalselt stabiilsust; antikoodonõlas on Ψ39 ja lingus Ψ38 (joonis 7). (Charette ja Gray, 2000)



Joonis 7. Pseudouridiinide paiknemine tRNA-s. Mustade ringidena on tähistatud Ψ-d, mis on samades positsioonides konserveerunud bakteritel, arhedel ja eukarüootidel. Hallid ringid ja ruudud tähistavad Ψ-sid, mille positsioonid erinevad bakteritel, arhedel ja eukarüootidel. Hallid ruudud tähistavad antikoodonjärjestust. Punktiirjoon antikoodonõlas tähistab mittekanoonilist aluspaari. Hallid numbrid tähistavad nukleotiide, millest algab RluA sünteesiprotsess. (Charette ja Gray, 2000, muudetud)

1.2.3 Pseudouridiinide bioloogiline olulisus

Kuigi pseudouridiinide otsene roll pole selge, on teada, et Ψ-de olemasolu mõjutab lokaalselt kohta kus nad asuvad, muutes RNA-d jäigemaks ja seeläbi stabiilsemaks (Davis jt., 1998). Lisaks suurendavad Ψ-d aluspaaride stäkkumist (Davis, 1995).

RluA, RluC ja RsuA on Ψ süntaasid, mis on paigutatud samasse perekonda sarnase järjestuse ja struktuuri alusel. RluA modifitseerib uridiine nii 23S rRNA-s kui ka tRNA-s, RluC modifitseerib uridiine 23S rRNA-s ning RsuA modifitseerib neid 16S rRNA-s. *E. coli* tüvedes, kus on katkestatud kas *rluA* (Raychaudhuri jt., 1999), *rluC* (Conrad jt., 1998) või *rsuA* (Conrad jt., 1999) geen, on näha, et geeni rikkumine ei mõjuta rakkude kasvukiirust. Kuid koos kultiveerimisel konkureerisid *E. coli wt* rakud *rluA*, *rluC* või *rsuA* mutantsed rakud välja. Eriti suurt efekti märgati *rluA* mutandi puhul. RluD kuulub samuti RluA perekonna Ψ süntaaside hulka ja see modifitseerib uridiine 23S rRNA-s. Erinevalt nimetatutest, inhibeerib *rluD* rikkumine tugevalt rakkude kasvu (Raychaudhuri jt., 1998, Raychaudhuri jt., 1999).

Ψ-sid stabiliseeriv mõju on oluline tRNA antikoodon-õlg-lingus (ASL ingl k – *anticodon-stem-loop*). TruA on Ψ süntaas, mis modifitseerib 18 erinevas tRNA-s 38., 39. ja 40. positsioonis asuvad uridiinid Ψ-deks (Kammen jt., 1988). *E. coli*s on nähtud, et kui deleteerida TruA perekonna Ψ süntaasi geen *truA*, siis tekivad probleemid ribosoomi A-saidis tRNA väljavalimisega, aeglustub peptiidsidemete moodustumine ning rakkude generatsiooniaeg väheneb ligi 30%. (Tsui jt., 1991)

Varasemalt on sünteesitud *in vitro* modifikatsioonideta *E.coli* tRNA^{Phe}. Sellise tRNA-ga viidi läbi *in vitro* translatsioon ning leiti, et modifikatsioonide puudumisel ei hoita antikoodonit õiges konformatsioonis. Seetõttu ei tõrjuta valesid koodon-antikoodon paare sama efektiivselt välja ning translatsioon muutub ebatäpsemaks. (Harrington jt., 1993)

Mõnikord võib Ψ olla antikoodonis. Näiteks *E. coli* tRNA^{Tyr} antikoodonis asub 35. positsioonis Ψ, mida sünteesib Ψ süntaas RluF ja mille puudumisel väheneb translatsioonil türosiinide äratundmine ja see takistab valgusünteesi. Katses vaadati *in vitro* lutsiferaasi translatsiooni. Tulemustes nähti, et *rluF* geeni puudumisel oli lutsiferaasi ekspressiooni tase madal sel juhul, kui kodeeriva järjestuse ees oli mitu türosiini koodonit. (Addepalli ja Limbach, 2016)

Eukarüootide hulgast leidub näide sellest, kuidas antikoodonis asuv Ψ võimaldab alternatiivset koodonkasutust. Nimelt meritähe mitokondris leidub tRNA^{Asn}, mille antikoodoniks on GΨU, mis transleerib AAA lüsiini koodonit aspargiinina (Yokobori jt., 2001). Ka rRNA-s on Ψ-del stabiliseeriv roll, sest nende olemasolul viiakse korrektsemalt läbi ribosoomi ja tRNA vahelisi interaktsioone. See omakorda suurendab peptiidsideme moodustumise efektiivsust. (Lane jt., 1995, Ofengand jt., 1995)

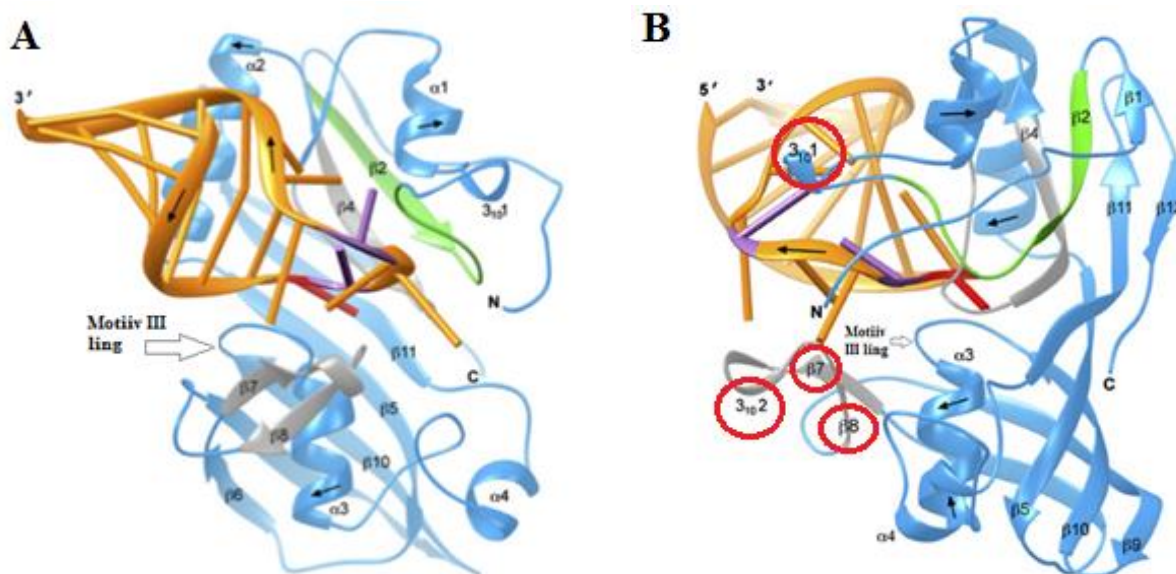
1.3 Pseudouridiini süntaas RluA

RluA on pseudouridiini süntaas, mis kuulub samanimelisse Ψ süntaaside perekonda. RluA tähistab ingl k – *Ribosomal large subunit pseudo U formation* või *modification*. *E. coli* RluA koosneb 219 aminohappest ja valgu molekulmass on 24,432 daltonit. Võrreldes teiste Ψ süntaasidega on RluA eriline kahetise substraadi spetsiifilisuse poolest. Nimelt RluA modifitseerib uridiini nii tRNA-s (positsioonis 32), kui ka 23S rRNA-s (positsioonis 746) (Wrzesinski jt., 1995). *E. coli*s modifitseerib RluA nelja tRNA-d: tRNA^{phe}, tRNA^{cys}, tRNA^{leu4} ja tRNA^{leu6} (Raychaudhuri jt., 1999).

RluA katalüütiliseks aktiivuseks on oluline 64. positsioonis asuv aspargiinhappejääk konserveerunud järjestuses HRLD. On teada, et RluA ei vaja *E. coli*s Ψ -de sünteesi läbiviimiseks kofaktoreid ning RluA on ainus valk, mis tRNA-s 32. ja rRNA-s 746. positsiooni Ψ -d sünteesib. (Raychaudhuri jt., 1999)

1.3.1 RluA struktuur

E. coli RluA tertsiaarstruktuur moodustub omavahel läbisegi asetsevatest α -heeliksitest ja β -lehtedest. Struktuur jaguneb südamikuks ja perifeerseteks osadeks. Südamiku moodustavad 8 β -lehte, milles asub vagu, mille põhjas omakorda paikneb aktiivtsenter. RluA struktuur jagatakse kolmeks motiiviks. Motiiv I hoiab aktiivtsentri lingu paigal, kuid ei asu ise aktiivtsentris. Motiiv II sees asub katalüütiline aspargiinhappejääk. Motiiv III C-terminaalne ots moodustab osa aktiivtsentri vaost ja N-terminaalne osa seondub modifitseerimiskohas substraat RNA selgrooga (joonis 8, A). Katalüütilist vagu ümbritsevad perifeersed struktuursed elemendid, nimelt nimetissõrme ja pöidla struktuurid. Nimetissõrme moodustavad motiiv I-ga külgnevas heeliksis ($3_{10}1$) ning motiivi C-terminaalses otsas asuvad aminohappejäägid. Nimetissõrme struktuur asetub tRNA antikoodonlingu väikese vao vastu. Pöial koosneb kahest beeta lehest ($\beta 7$ ja $\beta 8$) ning ühest heeliksist ($3_{10}2$). Pöidla struktuur asetub antikoodonlingu suure vao vastu ning koos hoiavad mõlemad struktuurid RNA-d isomerisatsiooni ajal kinni (joonis 8, B). (Hoang jt., 2006)



Joonis 8. *E. coli* RluA-RNA kompleksi struktuur. RluA on tähistatud helesinise värviga. Roheline värv märgib RluA motiiv I ja hall värv tähistab motiiv II ning „pöidla” struktuuri. RNA on värvitud oranžilt, modifikatsioonisaht punaselt, nukleotiidid mis kuuluvad pöör-Hoogsteen paari lillalt. Punased ringid tähistavad linge ja heelikseid, mis moodustavad RluA nimetissõrme ja pöidla struktuure. Pildid A ning B kujutavad samat struktuuri, kuid B on 90° võrra mööda vertikaalset telge keeratud. (Hoang jt., 2006, muudetud)

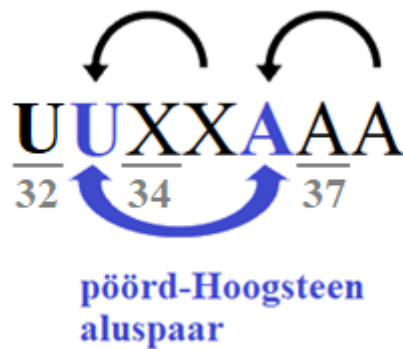
1.3.2 RluA kahetine substraadispetsiifilisus ja äratundmisreaktsiooni mehhanism

RluA on eriline süntaas, kuna see modifitseerib uridiine nii tRNA-s, kui ka rRNA-s. tRNA ja rRNA on üldjoontes väga erineva järjestuse ja struktuuriga. RluA tunneb sihtmärkuridiini ära mõlemast, kuna äratundmissaidis on modifitseeritavast uridiinist 3' suunas samasugune järjestus ja struktuur. Kõigil *E. coli* RluA substraatidel on konserveerunud järjestus ΨUXXAAA, kus X tähistab ükskõik millist nukleotiidi. (Hoang jt., 2006)

RluA võime kahte erinevat substraati modifitseerida on eriline, kuid see pole päris ainuke taoline ensüüm. Leitud on veel üks Ψ süntaas *E. colis* – RluF, mis modifitseerib uridiine nii 23S rRNA-s, positsioonis 2604, kui ka tRNA^{Tyr} 35. positsioonis. RluF kuulub Ψ süntaaside perekonda RsuA. (Addepalli ja Limbach, 2016)

RluA-ga seondudes muutub olulisel määral tRNA konserveerunud sihtmärkjärjestuse struktuur. Toimub neli suuremat muutust. Esiteks pööratakse tRNA-st välja nukleotiidid positsioonides 32, 34 ja 37 (joonis 7 ja 9). Seejärel täidab adeniin 36. positsioonis koha, mis jäi vabaks 37. nukleotiidi väljumisel. Seejärel stäkkub 38. adeniin 36. adeniini alla. Lisaks moodustab see sama 36. adeniin pöör-Hoogsteen aluspaari 33. positsioonis asuva uridiiniga. Seejärel stäkkub pöör-Hoogsteen aluspaari kuuluva 33. uridiini alla 35. positsioonis asuv nukleotiid (joonis 9).

Enamus RluA-tRNA interaktsioone toimub ASL 5' poolsel küljel. Substraadi äratundmiseks on kõige olulisemad pöörd-Hoogsteen paari moodustavad nukleotiidid. Pöörd-Hoogsteen aluspaari moodustumine on sünteesi toimumiseks kõige olulisem ja nende vahelise sideme rikkumine takistab pseudouridiinide moodustumist. (Hoang jt., 2006)



Joonis 9. Üldine skeem struktuursetest muutustest, mida RluA seondumine tRNA sihtmärkjärjestusega esile kutsub. Allajoonitud positsioonid tähistavad nukleotiide, mis RluA mõjul tRNA struktuurist välja pöörduvad. Siniselt on tähistatud pöörd-Hoogsteen aluspaar, mis tekib 33. uridiini ja 36. adeniini vahele. Mustad nooled tähistavad 35. ja 38. positsiooni nukleotiidide stäkkumist pöörd-Hoogsteen aluspaari moodustavate nukleotiidide alla.

Selleks, et sihtmärk uridiin saaks katalüütilise aspargiinhappejäägiga kontakti luua, pöörduv uridiin RluA mõjul ahelast väljapoole. Sellel hetkel muutub oluliseks RluA 62. positsioonis asuv arginiin, sest see täidab koha, mis vabaneb uridiini väljapööramise tagajärjel. Interaktsioonid, mis 62. positsiooni arginiini ja RNA vahel toimuvad, tasakaalustavad energiakadu, mis kaasneb 32. positsioonis asuva uridiini väljapööramisega. (Hoang jt., 2006)

tRNA-s asub konsensusjärjestus lingus, mis koosneb seitsmest nukleotiidist. Kuigi rRNA-s on konsensusjärjestus sama, koosneb ling, milles see asub, kaheksast nukleotiidist. Arvatavasti moodustub rRNA puhul pöörd-Hoogsteen paar 747. uridiini ja 750. adeniini vahele. Tõenäoliselt moodustab 62. positsioonis olev arginiin rRNA-s mittekanoonilise sideme lingu kaheksanda nukleotiidiga (752. adeniin). Üldjoontes on rRNA-RluA stuktuur väga sarnane tRNA-RluA struktuurile. (Hoang jt., 2006)

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärgid

RNA modifitseerimine on evolutsiooniliselt konserveerunud protsess. Modifikatsioonid on vajalikud selleks, et erinevad RNA molekulidest sõltuvad protsessid kulgeksid võimalikult veatult. Arvatavasti asuvad just seetõttu modifikatsioonid suurema sagedusega piirkondades, mis on olulised RNA molekuli funktsionaalsuseks. Näiteks rRNA-s asub suurem osa modifikatsioone ribosoomi peptidüültransferaase tsentri ja polüpeptiidi väljumistunneli ümbruses (Krzyszosiak jt., 1987, Lane jt., 1995, Ofengand jt., 1995). tRNA funktsionaalsuseks on eriti olulised just need modifikatsioonid, mis paiknevad ASL piirkonnas. Just ASL piirkonnas leidub tRNA-del modifikatsioone eriti rohkearvuliselt. Need stabiliseerivad tRNA struktuuri ja suurendavad seeläbi translatsioonitäpsust ning efektiivsust. (Hall jt., 1989, Harrington jt., 1993)

Pseudouridiinid on kõige laialdasemalt esinevad RNA modifikatsioonid (Davis ja Allen, 1957). Ψ -de olulisust näitab see, et bakteritel ja eukarüootidel (ning arhedel) on eraldiseisvalt välja arenenud erinevad mehhanismid pseudouridiinide sünteesimiseks (Decatur ja Fournier, 2002). Lisaks on täheldatud, et sellised *E. coli* tüved, millel on puudu üks või mitu Ψ -d nii rRNA-s kui ka tRNA-s, on mõnikord madalama kasvukiirusega ning *wt* rakkudega koos kasvades jäävad konkurentsile *wt* rakkudele alla (Krzyszosiak jt., 1987, Raychaudhuri jt., 1999).

Meie laboris on eelnevalt näidatud, et Ψ -d, mida sünteesib pseudouridiini süntaas TruA, mõjutavad mutatsioonisagedust *P. putida* rakkudes (Tagel jt., 2016). TruA on võimeline sünteesima Ψ -sid tRNA antikoodonlingu lähedusse positsioonidesse 38-40 (Kammen jt., 1988). Antikoodonist teisel pool, 32. positsioonis, asub osadel tRNA-del veel üks Ψ , mida sünteesib Ψ süntaas RluA. Arvestades RluA ja TruA tehtavate modifikatsioonide sarnast paigutust antikoodoni suhtes, püstitati käesoleva töö eesmärkideks:

- Konstrueerida *P. putida rluA* deletsioonitüved.
- Selgitada välja kas *rluA* defektsus mõjutab *P. putida* mutatsioonisagedust ja kasvukiirust.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Kasutatud söötmed, tüved ja plasmiidid

Baktereid kasvasime LB (ingl k – *lysogeny broth*) täissöötmes (Miller, 1992) või M9-glükoos-CAA (ingl k – *casamino acids*) söötmes (edaspidi glc CAA), mille valmistamiseks lisasime M9 puhvrissi (42 mM KH₂PO₄, 24 mM Na₂HPO₄, 19 mM NH₄Cl, 9 mM NaCl) mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 667 µM MgO, 50 µM CaCO₃, 40 µM FeSO₄, 12,5 µM ZnSO₄, 12,5 µM MnSO₄, 2,5 µM CuSO₄, 2,5 µM, CoSO₄, 1,9 µM H₃BO₄), glükoosi (glc; lõppkontsentratsiooniga 0,2%) ning kaseiini hüdroolüsaati lõppkontsentratsiooniga 0,2%. Vedelsöötmes kasvatamisel aereerisime kultuure loksutil. Tardsöötme valmistamiseks lisasime söötmesse agarit 1,5 g/l. Kasutatud tüvede nimikiri on toodud tabelis 1.

Selektsioonimarkeritena kasutasime järgmisi antibiootikume: kanamütsiin (Km; 50 µg/ml), bensüülpenitsilliin (Bp; 1,5 mg/ml), rifampitsiin (Rif; 100 µg/ml) ja ampitsilliini (Amp; 100 µg/ml). *P. putida* rakke kasvasime temperatuuril 30 °C ja *E. coli* rakke temperatuuril 37 °C. Kolooniate sini-valge testi läbi viimiseks (*lacZ* geeni ekspressiooni tuvastamiseks) lisasime LB-söötmele 0,5 mM IPTG-d ja X-gal-i (100 µg/ml).

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

BAKTERITÜVED	Iseloomustus	Allikas
<i>E. coli</i> DH5α λpir	supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1endA1 gyr A96 thi-1 relA1	(Miller, 1992)
<i>P. putida</i> PaW85	<i>P. putida</i> algne tüvi, isogeenne sekveneeritud KT2440 tüvega	(Bayley jt., 1977)
<i>P. putida</i> PaW85 ΔtruA	deleteeritud geen <i>truA</i>	(Tagel jt., 2016)
<i>P. putida</i> PaW85 ΔrluA	deleteeritud geen <i>rluA</i>	Käesolev töö
<i>P. putida</i> PaW85 ΔrluAΔtruA	tüvest Paw85ΔtruA deleteeritud <i>rluA</i> geen	Käesolev töö
<i>P. putida</i> PaW85 ΔrluA tac-rluA	minitransposoon Tn7 koosseisus Paw85ΔrluA tüvesse viidud <i>lacI</i> geen ja <i>tac</i> promootori kontolli all <i>rluA</i> geen, Gm ^R	Tagel ja Ilves, avaldamata
<i>P. putida</i> PaW85 ΔrluA mut-rluA	minitransposoon Tn7 koosseisus Paw85ΔrluA tüvesse viidud <i>lacI</i> geen ja <i>tac</i> promootori kontolli all <i>rluA</i> geen, millel on 64. Asp asendatud Ala-ga, Gm ^R	Tagel ja Ilves, avaldamata
PLASMIIDID		
pBluescript KS	<i>E. coli</i> kloonimisvektor, Amp ^R	Stratagene
KS/ΔrluA	pBluescript KS plasmiid, kuhu on kloonitud geeni <i>rluA</i> eelse ja järgse ala EcoRI ja BamHI liitfragment, Amp ^R	Käesolev töö
pEMG	I-SceI restriksioonisaite ja multikloonimisjärjestust sisaldav suitsiidplasmiid, Km ^R	(Martínez-García jt., 2011)
pEMG/ΔrluA	pEMG plasmiid, kuhu on kloonitud EcoRI ja BamHI fragmendina geeni <i>rluA</i> eelse ja järgse ala liitfragment, Km ^R	Käesolev töö
pSW (I-secI)	I-SceI nukleaasi ekspresseeriv plasmiid, Amp ^R	(Wong ja Mekalanos, 2000)
pKTpheA22TAG	aluste asendusmutatsioone detekteeriv plasmiidne testsüsteem, kus plasmiidis pKT240 sisalduva pheA geeni 22. koodon CTG (Leu) on asendatud stoppkoodoniga TAG, Amp ^R	(Tegova jt., 2004)

2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

P. putida kompetentsete rakkude saamiseks kasvasime neid 5 ml-s vedelsöötmes üleöö. Üleöökuultuuri tsentrifuugisime kokku 250 µl või 1 ml (deletsioonitüvede konstrueerimisel kointegraatide valmistamiseks) rakke (1 min 12000 x g) ning pesime kolm korda 500 µl 300 mM sahharoosi lahusega. Seejärel suspendeerisime rakke 70-80 µl 300 mM sahharoosi lahuses.

E. coli kompetentsete rakkude saamiseks kasvasime rakke üleöö 5 ml-s LB vedelsöötmes. Üleöökuultuuri lahjendasime värskesse LB vedelsöötmesse optilise tiheduseni 0,1 (OD₅₈₀) ning kasvasime rakke loksutil lisaks kaks tundi. Seejärel tsentrifuugisime kokku kogu rakukultuuri (1 min 12000 x g) ja pesime kaks korda 800 µl külma veega ning kolmas kord 800 µl 10% glütseroolilahusega. Lõpuks suspendeerisime rakud 50 µl 10% glütseroolilahuses. Kogu protseduuri vältel hoidsime rakke jääl.

Elektroporatsiooniks lisasime *E. coli* või *P. putida* rakkudele ligikaudu 100 ng plasmiidset DNA-d. Elektroporatsioonil kasutasime firma *BioRad* elektroporaatorit „*E. coli* Pulser“ pingel 2500 V. Pärast elektroporatsiooni lisasime rakkudele 800 µl LB-vedelsöödet ning kasvasime neid ligikaudu tund aega loksutil, *E. coli* rakke 37 °C ning *P. putida* rakke 30 °C temperatuuril. Seejärel tsentrifuugisime rakud põhja, suspendeerisime ligikaudu 100 µl LB-söötmes ning plaatisime selektiivtassile.

2.2.3 PCR

PCR kasutasime tüvede ning konstruktide kontrollimisel. Ühe PCR reaktsiooni maht oli 20 µl. Reaktsioonisegu sisaldas 1 x PCR-i puhvrit, 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP-d; 0,5 ühikut Taq või Pfu polümeraasi ühe reaktsiooni kohta ja praimereid kontsentratsiooniga 10 pmol reaktsiooni kohta. Kasutatud praimerite nimekiri on tabelis 2. PCR-i segule lisasime bakterirakkude kromosomaalset DNA-d või ligikaudu 10 ng eraldatud DNA-d.

PCR-i teostasime järgmistes tingimustes: DNA denaturatsioon 96° C 30-60 sekundit, praimerite seondumine temperatuuril 55-56 °C (sõltuvalt praimeri GC sisaldusest ja pikkusest) 30 sekundit, DNA süntees temperatuuril 72° C 30-60 sekundit (sõltuvalt amplifitseeritava DNA pikkusest). Reaktsiooni toimus kokku 25 tsüklit. Esimesele tsüklile eelnes 120-sekundiline eelkuumutus temperatuuril 96 °C rakkude lõhkumiseks ja viimasele 2–4 minuti pikkune järelsüntees temperatuuril 72 °C, pooleli olevad fragmentide lõpuni sünteesimiseks.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

Nimetus	Järjestus	Iseoomustus
RluA-del	5'-GCAGTGC GGCCCTTGCAGGATAGCAGTAA ACGCTGGGGC-3'	Kasutati <i>rluA</i> eelse ala amplifitseerimisel. Seondub <i>rluA</i> ette suunaga geenist eemale. 5' ots on komplementaarne RluA-out praimeriga
BH-minD	5'-AGGATCCGCCTGCTGGGCAAAGAGAAG-3'	Kasutati <i>rluA</i> eelse ala amplifitseerimisel ning <i>rluA</i> eelse ja järgse ala „ <i>sewing</i> ” PCR-il. Seondub <i>rluA</i> ette suunaga geeni poole. BamHI lõikesait allajoonitud.
RluA-out	5'-TCCTGCAAGGGCCGCACTGC-3'	Kasutati <i>rluA</i> järgse ala amplifitseerimisel. Seondub <i>rluA</i> taha suunaga geenist eemale.
ER-PP1730	5'-AGAATTCTGTAGCTCGGGCTGAGGCTTG- 3'	Kasutati <i>rluA</i> järgse ala amplifitseerimisel ning <i>rluA</i> eelse ja järgse ala „ <i>sewing</i> ” PCR-il. Seondub <i>rluA</i> taha suunaga geeni poole. EcoRI lõikesait allajoonitud.
Forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	plasmidi pBluescript KS universaalpraimerid
Reverse	5'-AACAGCTATGACCATG -3'	
pSW-F	5'-GGACGCTTCGCTGAAAATA-3'	Seondub pSW(Isce-I) plasmiidile suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
pSW-R	5'-AACGTCGTGACTGGGAAAA-3'	Seondub pSW(IsceI) plasmiidile, suunaga multikloneerimisjärjestuse poole
pheABamEI	5'-AAGGCGGCTCCCGTAAGACA-3'	Seondub <i>pheA</i> geeni eelneva alaga positsioonides -22 kuni -40 initsiaatorkoodonist ATG, suunaga geeni poole
pheAtsII	5'-GTTCATGGGGGACTGCTTC-3'	Seondub <i>pheA</i> geeni alaga positsioonides 295-313 nukleotiidi allavoolu translatsiooni startkoodonist ATG

2.2.4 Plasmidi eraldamine ja restriksioonianalüüs

Plasmidse DNA eraldamiseks rakkudest kasutasime firma *Favorgen* plasmidi eralduskomplekti *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*, järgides tootja etteantud protokoll.

Eraldatud DNA kontrollimiseks tegime restriksioonanalüüsi. DNA restriksiooniks kasutasime firma *Thermo Scientific* restriктаase ja järgisime analüüsil tootja poolt etteantud tingimusi. Restriksiooni reaktsiooni tulemused visualiseerisime geelelektroforeesiga.

2.2.5 Geelelektroforees

PCR-i produkte ja restriктаasidega lõigatud DNA-d analüüsisime geelelektroforeesil. Selleks lisasime 5–20 µl-ile PCR-i produktile või restriksioonisegule foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinine 50% glütseroolis). Seejärel kandsime proovid 1% agarosgeelile 1 x TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas 0,33 µg/ml kontsentratsioonis etiidiumbromiidi. DNA fragmentide suuruse mõõtmiseks kasutasime firma *Thermo Scientific* DNA markerit. Elektroforees toimus pingel 100–150 volti. DNA visualiseerisime UV valguses.

2.2.6 Kloonimine

Kloonimist kasutasime deletsioonitüvede konstrueerimisel soovitava fragmendi sisestamiseks vektorplasmidi. Kõigepealt valmistasime reaktsioonisegud, kus lõikasime vektorit ning sellesse kloonitavat produkti samade restriктаasidega. Peale lõikust töötlesime kloonimisvektorit 1 ühiku aluselise fosfataasiga FastAP (*Thermo Scientific*) 15 minuti jooksul 37 °C juures, et vältida hiljem vektori iseendaga kokku ligeerumist. Restriктаaside ning FastAP inaktiveerimiseks viisime läbi reaktsioonisegu 10 minutilise 80 °C termotöötuse. Seejärel sadestasime restriksioonisegud 2,5-kordses mahus 96% etanooli ja 0,1-kordses mahus 5M NaCl lahusega temperatuuril -20 °C 10 minutit. Sademe tsentrifuugisime põhja (12000 x g) 10 minuti jooksul temperatuuril 4 °C ning pesime 75% etanooliga. Saadud sadet kuivatasime temperatuuril 37 °C. Restriksioonifragmentide ligeerimiseks lahustasime sadestatud DNA vees ja valmistasime ligeerimisreaktsiooni segu 20 µl mahus. Ligaasisegu sisaldas ühekordset ligaasi puhvrit (*Thermo Scientific*), 1mM ATP-d ja 0,5 ühikut T4 ligaasi (*Thermo Scientific*). Reaktsioon toimus üleöö temperatuuril 16-20 °C. Seejärel sadestasime ligaasisegu sarnaselt restriksioonisegudele ja lahustasime 20 µl vees. Edasi elektroporeerisime 10 µl ligaasisegu *E. coli* DH5αpir, *P. putida* PaW85 või PaW85Δ*truA* rakkudesse. pBluescript KS vektori puhul kontrollisime kloonimise õnnestumist sini-valge testi abil. Test põhineb vektoris oleva β-galaktosidaasi geeni *lacZ* lugemisraami rikkumisel soovitava fragmendi insertsiooniga, mille läbiviimiseks plaatisime KS vektoriga tüved IPTG-d, X-gal-i ja Amp sisaldavale LB-

tardsöötmele, kus valgeid kolooniaid moodustavad fragmendi insertiooniga plasmidi kandvad tüved ja siniseks värvuvad tühja vektoriga tüved.

2.2.7 *ΔrluA* tüvede konstrueerimine

ΔrluA ja *ΔrluAΔtruA* tüvede konstrueerimisel kasutasime Posfai töögrupi (Pósfai jt., 1999) ning Martinez-Garcia ja de Lorenzo (Martínez-García jt., 2011) loodud meetodit, modifitseerituna. Esmalt amplifitseerisime PCR-iga *rluA* eelset ja järgset ala umbes 500 bp ulatuses. Selleks kasutasime praimeripaare RluA-del ja BH-minD ning RluA-out ja ER-PP1730 (tabel 2). PCR saadust töötlesime ExoI ja DnpI-ga, et lagundada vabad nukleotiidid ning kromosomaalne DNA. RluA-del praimer sisaldas 5' otsas *rluA*-out praimeriga komplementaarset järjestust ja nii sai praimeritega BH-minD ja ER-PP1730 teha eelnevalt tekitatud PCR produktidega „sewing“ PCR-i, mille käigus liitusid kokku geeni eelne ja tagune fragment, tekitades ligikaudu 1000 bp pikkuse *ΔrluA* fragmendi. Seejärel kloonisime *ΔrluA* fragmendi pBluescript KS plasmidi. Selleks lõikasime plasmidi ja fragmenti firma *Thermo Scientific* restriктаasidega EcoRI ja BamHI. *E. coli* DH5αpir rakkudesse poreeritud KS/*ΔrluA* plasmide selekteerisime sini-valge testiga ning kontrollisime PCR-iga. DH5αpir tüvest eraldasime KS/*ΔrluA* plasmidi ning seejärel kloonisime *ΔrluA* fragmendi pEMG plasmidi, kasutades pEMG vektori avamiseks ja *ΔrluA* fragmendi välja lõikamiseks KS plasmidist samu restriктаase, mida eelnevalt ja selekteerimiseks kasvasime rakke Km sisaldaval söötmel. Seejärel amplifitseerisime PCR-iga *ΔrluA* fragmenti, kasutades primereid Forward ja Reverse (tabel 2) ning sekveneerisime, et kontrollida ega *ΔrluA* fragmenti ei ole PCR-i käigus tekkinud mutatsioone. Seejärel viisime korrektset DNA järjestust sisaldava plasmidi elektroporatsiooniga bakterisse *P. putida* PaW85 ning PaW85*ΔtruA*, kus see plasmid ei replitseeru ning inserteerub bakteri kromosoomi. Moodustunud kointegraadiga rakke selekteerisime Km sisaldaval söötmel. Kointegraadi olemasolu kontrollisime PCR-ga, kasutades primereid BH-minD ja ER-PP1730. Järgnevalt viisime elektroporatsiooni abil rakkudesse I-SceI nukleaasi kodeeriva plasmidi pSW(I-SceI), kasutades selektsiooniks Km ja Bp sisaldavat LB-söödet. Selleks, et indutseerida plasmidilt pSW(I-SceI) I-SceI nukleaasi, mis tekitaks kaheaahelalisi lõikeid I-SceI restriksioonisaitides kromosoomi integreerunud pEMG/*ΔrluA* plasmidis, kasvasime rakke üleöö 30 °C loksutil 5 ml LB-vedelsöötmes. Söötmele lisasime 3mM meta-toluaati, mis on I-SceI promootori induktor. Katkete tekkimise tagajärjel toimub homoloogiline rekombinatsioon *ΔrluA* fragmendi ja kromosoomis olevate *rluA* geeni eelse või *rluA* järgse ala vahel. Kui homoloogiline rekombinatsioon toimub, siis pole tüved enam võimelised Km kasvama ja nendest tüvedest pooltel juhtudel deleteerub *rluA* geen

ning pooltel jääb *wt* lookus. Selleks et näha, kas homoloogiline rekombinatsioon on toimunud ja plasmiid välja rekombineerunud, lahjendasime üleöö kultuuri üksikkolooniateks LB tassile. Seejärel tegime paralleelkülvi LB tassidele, mis sisaldasid selektsiooniks Km. Km suhtes tundlikes kolooniates kontrollisime *rluA* geeni deleteerumist PCR-iga, kasutades praimereid BH-minD ja ER-PP1730. Seejärel vabanesime deletsioonitüves pSW(I-SceI) plasmiidist, kasvatades baktereid antibiootikumita 5 ml LB vedelsöötmes ning tõmmates 5 µl üleöö kultuuri LB-tassil üksikkolooniateks. pSW(I-SceI) kadumist kontrollisime kolooniate paralleelkülviga LB ja Bp tassidele. Kanamütsiini tundlikke kolooniaid kontrollisime ka PCR-iga, kasutades praimereid pSW-F ja pSW-R (tabel 2), mis peaksid andma produkti plasmidi olemasolul. Konstrueeritud tüvesid kontrollisime lõpuks ka sekveneerimisega.

2.2.8 Sekveneerimine

Sekveneerimist kasutasime deletsioonitüvede konstrueerimisel kontrollina. Esiteks eemaldasime reaktsioonisegust kasutamata jäänud praimerid ja nukleotiidid. Selleks töötlesimeprodukte 1 ühiku aluselise fosfataasiga FastAP (*Thermo Scientific*) ja 2,5 ühiku eksonukleasiga ExoI (*Thermo Scientific*), reaktsiooni segu maht oli 10 µl-i. Reaktsioon toimus 30 minutit temperatuuril 37° C ning ensüümid inaktiveeriti 15 minuti jooksul temperatuuril 80° C. Sekveneerimiseks valmistasime proovid ette kitiga „*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*“ (*Applied Biosystem*). Reaktsiooni võtsime 1 µl eelnevalt kirjeldatud töötluste produkti ning praimerina kasutasime Forwardit, 1,6 pmol ühe reaktsiooni kohta, või ER-PP1730 ja BH-minD, 10 pmol ühe reaktsiooni kohta. DNA järjestused määrati 3730xl kapillaarsekvenaatoriga (*Applied Biosystem*). Saadud järjestuste analüüsimiseks kasutati programme *BioEdit* ja *UniProti ClustalO*.

2.2.9 Rif^R mutantide tekkesageduse leidmine Rif^R/*rpoB* testsüsteemiga

Selleks, et leida erinevate *P. putida* tüvede mutatsioonisagedust eksponentsiaalses faasis kasutasime Rif^R/*rpoB* testsüsteemi. Selleks kasvasime *P. putida* tüvesid 6-7 tundi Glc-CAA söötmes temperatuuril 30 °C. Seejärel tegime värskesse Glc-CAA söötmesse 10⁵-kordsed lahjendused ja jagasime kultuurid 2,3 ml kaupa katseklaasidesse laiali. Kultuure kasvasime 18-20 tundi loksutil temperatuuril 30 °C. Seejärel plaatisime 500 µl kultuuridest Rif-tassidele ja inkubeerisime temperatuuril 30 °C kaks päeva. Rif^R kolooniaid loendasime 24 ja 48 tunni möödudes. (Jatsenko jt., 2010)

Bakterirakkude elumust määrasime kolooniaid moodustavate rakkude (CFU ingl k – colony forming unit) arvukuse põhjal. Selleks tegime lahjendused ühekordsesse M9 puhvrisesse ja

kandsime lahjedatud kultuurist 5 µl tilga LB-tassidele. Pärast üleöö inkubeerimist temperatuuril 30 °C, loendasime tilgast kasvanud kolooniaid. Tilgast kasvanud kolooniate ja rakukultuuri lahjenduste põhjal arvutasime elusrakkude hulga 1 ml-s üleöö kultuuris. Teades plaaditud rakukultuuri elumust ning selektiivsöötmel ilmunud Rif^R kolooniate arvu, leidsime mutantide sageduse sellise valemi järgi:

$$\text{Mutantide sagedus} = \frac{\text{Mutantide arv / ml}}{\text{CFU / ml}}$$

2.2.10 Phe⁺ mutantide tekkesageduse leidmine plasmiidse TAG testsüsteemiga

Selleks, et mõõta *P. putida* PaW85 ja sellest konstrueeritud deletsioonitüvede mutatsioonisagedust statsionaarses kasvufaasis, kasutasime plasmiidset TAG testsüsteemi. Selleks viisime elektroporatsiooniga plasmiidse TAG testsüsteemi *wt* ja deletsioonitüvedesse. TAG süsteem kujutab endast plasmidi pKT240, millesse on viidud defektne fenooli monooksügenaasi geen *pheA* (stoppkoodon TAG 22. positsioonis) (Tegova jt., 2004). Fenooli monooksügenaasi geen võimaldab bakteril kasutada fenooli süsinikuallikana, seega kui asendusmutatsiooni tagajärjel kaob enneaegne stoppkoodon, siis suudab rakk kasutada fenooli süsinikuallikana.

6-7 tundi Glc-CAA kasvanud testsüsteemiga kultuurid lahjendasime ühekordses M9-s optilise tiheduseni 0,1 (OD₅₈₀) ja jaotasime 2,3 ml kaupa katseklaasidesse. Katseklaasides olevaid kultuure kasvasime 18-20 tundi. Seejärel plaatisime 500 µl sõltumatuid kultuure Phe-minimaaltassidele, kus ainsaks C-allikaks oli fenool, ja inkubeerisime temperatuuril 30 °C. Tassidele tekkinud kolooniaid loendasime 14 nälgimispäeva jooksul. Esimesed Phe⁺ kolooniad tekkisid kolmandal inkubatsiooni päeval. Bakterirakkude elumust määrasime katse jooksul iga kolme päeva tagant, kolooniaid moodustavate rakkude CFU arvukuse alusel fenooli minimaaltassidelt, millel olime jälginud Phe⁺ revertantide teket. Elusrakkude arvukuse määramisel lõikasime esmalt Phe-minimaaltassidelt agaritükke, kasutades steriilset ühemilliliitrist pipetiotsikut, ja vältides Phe⁺ kolooniaid. Agariketastel olevad rakud inkubeerisime ühekordses M9 lahuses loksutil 20 minuti jooksul temperatuuril 30 °C. Seejärel tegime lahjendused ühekordses M9-s ja kandsime erinevatest lahjendustest 10 µl LB-tassidele. Arvestasime, et agaritüki pindala on 1/100 kogu tassi pindalast. Lähtudes tassile tekkinud kolooniate arvust ja tehtud lahjendustest arvutasime agaritükil olevate elusrakkude arvu.

Saadud arvust tuletasime tassi pindala ja agaritüki pindala suhte alusel kogu elusrakkude arvu fenooli minimaaltassil. Phe⁺ reverantide tekkesageduse arvutasime tassil olevate elusrakkude kohta nii nagu eelnevalt Rif-i katse puhul.

2.2.11 Kasvukõverad ja generatsiooniaeg

Uuritavate tüvede kasvukiiruste leidmiseks kasvasime rakke üleöö glc CAA söötmes temperatuuril 30 °C. Üleöö kasvanud rakkudega inokuleerisime värsket glc CAA söödet nii, et uue söötme optiline tihedus oleks 0,1 (OD₅₈₀). Rakke kasvasime mikrotiiterplaadil 100 µl mahus temperatuuril 30 °C *POLARstar Omega* spektrofotomeetris, mis mõõtis optilist tihedust iga 10 minuti tagant 12 tunni jooksul. Saadud andmete põhjal koostasime kasvukõvera. Logaritmitud kasvukõvera eksponentsiaalse faasi järgi arvutasime igale tüvele generatsiooniajad. Generatsiooniaja arvutamisel kasutasime valemit:

$$G = \frac{t}{3,3 \log \frac{a}{A}}$$

G – minimaalne generatsiooniaeg

t – ajaintervall minutites

a – bakterite OD₅₈₀ ajavahemiku lõpus

A – bakterite OD₅₈₀ ajavahemiku alguses

2.2.12 Bioinformaatiline analüüs

Selleks, et leida tRNA-sid, mida RluA võiks *P. putida* rakkudes modifitseerida, kasutasime bioinformaatilist tööriista, mis võimaldab FASTA formaadis järjestuse põhjal ennustada tRNA-de tõenäolise sekundaarstruktuuri, antikoodoni järjestuse ja vastavalt sellele aminohappe, mida antud tRNA kanda võiks. (Lowe ja Chan, 2016)

2.2.13 Statistiline analüüs

Mutatsioonisageduse ja kasvukiiruse mõõtmise analüüsimisel kasutasime Studenti T-testi, andmehulkade statistilise erinevuse leidmiseks. P-väärtuse arvutamisel võtsime arvesse Bonferroni korrigeerimist.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 *P. putida* RluA substraatide virtuaalne analüüs

Kirjanduse ülevaates toodud andmed RluA kohta pärinevad *E. coli*-st. RluA modifitseerib *E. coli*s nelja tRNA-d: tRNA^{phe}, tRNA^{cys}, tRNA^{leu4} ja tRNA^{leu6} (Raychaudhuri jt., 1999). Bakteris *P. putida* pole RluA-d uuritud. Selleks, et *in silico* ennustada RluA modifitseeritavaid tRNA-sid *P. putida* rakkudes, analüüsisin *P. putida* tRNA nukleotiidseid järjestusi tRNAscan-SE programmiga. Kirjanduse andmetel võib eeldada, et sarnaselt *E. coli*-le modifitseerib RluA ka *P. putida*s tRNA-sid, millel asub 32. positsioonis uridiin ja millel on ka konsensusjärjestus ΨUXXAAA. Lisaks joendasime *E. coli* ja *P. putida* RluA valgujärjestused, millest selgus, et aminohappeliste järjestuste identsuse skoor oli 53%.

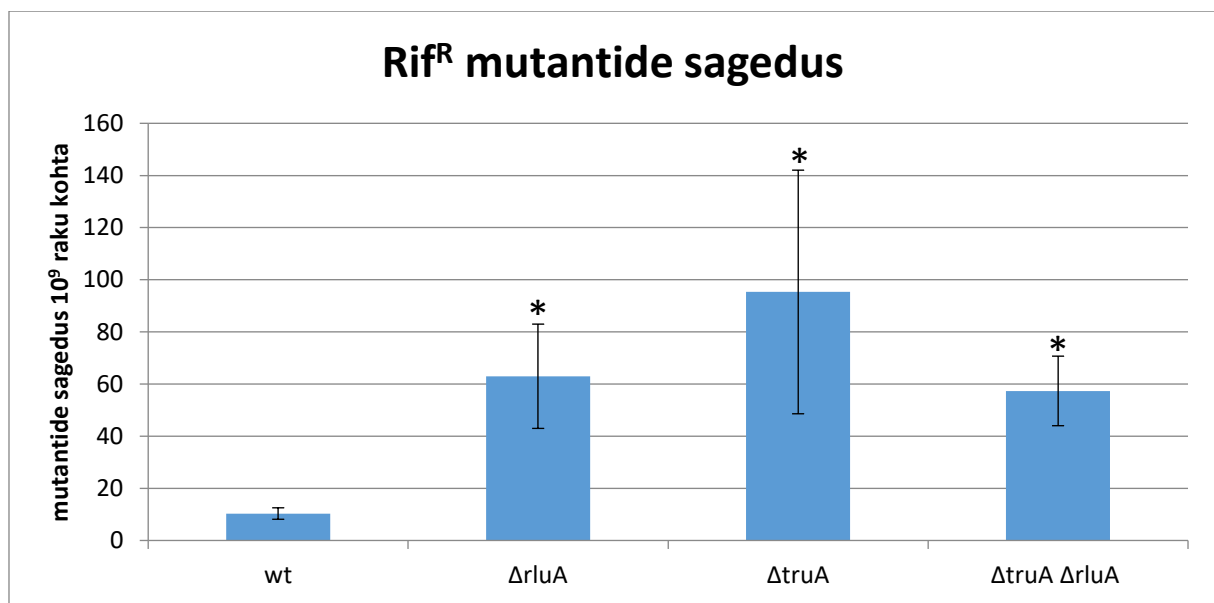
P. putida 75 tRNA geenide põhjal tRNA sekundaarstruktuuride visualiseerimiseks kasutasime programmi, mille algoritm ennustab FASTA formaadis järjestuse alusel kõige tõenäolisema tRNA sekundaarstruktuuri. Ennustatud struktuuri põhjal selgub ka see, millist aminohapet ennustatud tRNA kannab. (Lowe ja Chan, 2016) Analüüsist selgus, et tRNA^{Ser} (PP_t14), tRNA^{Cys} (PP_t61), tRNA^{Leu} (PP_t68) ja tRNA^{Phe} (PP_t72) geenidel on olemas 32. positsioonis uridiin ja sellele järgneb konsensusjärjestus. Sellest järeldame, et tõenäoliselt modifitseerib *P. putida* RluA neid 4 tRNA-d. Kuna *E. coli* RluA teeb pseudouridiini ka rRNA-sse, joendasime ka *P. putida* ribosoomi 23S rRNA-d *E. coli* omaga ja nägime, et ka rRNA-s on olemas sarnases asukohas U nukleotiid, millele järgneb konsensusjärjestus.

Virtuaalsest analüüsist on näha et sarnaselt *E. coli* RluA-ga, modifitseerib *P. putida* RluA potentsiaalselt nelja tRNA-d ning ühte uridiini rRNA-s. Varasemalt pole RluA-d *P. putida*s uuritud ja selleks, et uurida RluA mõju *P. putida* mutatsioonisagedusele, konstrueerisime *rluA* deletsioonitüve.

2.3.2 Pseudouridiini süntaasi RluA mõju *P. putida* eksponentsiaalse kasvufaasi rakkude mutatsioonisagedusele

Selgitamaks RluA sünteesitud pseudouridiinide mõju *P. putida* mutatsioonisagedusele kasutasime Rif^R/*rpoB* testsüsteemi, millega mõõtsime spontaansete mutatsioonide tekkesagedust *P. putida* $\Delta rluA$ eksponentsiaalse faasi rakkudes. Rifampitsiin (Rif) on antibiootikum, mis seondub RNA β subühikuga ja ei võimalda polümeraasil RNA sünteesi jätkata. Kui RNA polümeraasi β subühikut kodeerivas *rpoB* geenis on toimunud mutatsioon, mis rikub Rif seondumise RNA polümeraasiga, siis tekib bakteritel resistentsus rifampitsiinile. Katses lisasime LB-tardsöötmesse Rif-i kontsentratsioonil 100 µg/ml, mis on letaalne *P. putida*

rakkudele. Kui eksponentsiaalse faasi rakkudes on mutatsioonisagedus tõusnud, siis tõuseb ka mutatsioonide hulk *rpoB* geenis ning Rif-i sisaldavatel LB-tardsöötmetassidel kasvab üles tavalisest rohkem kolooniaid. Arvestades üldist elusrakkude arvukust milliliitris, saame kaudselt kolooniate hulga järgi arvutada mutatsioonisageduse (Jatsenko jt., 2010). Katses võrdlesime *P. putida* PaW85 algtüve (*wt*) ja konstrueeritud pseudouridiinide süntaaside deletsioonitüvede $\Delta rluA$ ning $\Delta truA$ eksponentsiaalse kasvufaasi mutatsioonisagedusi. Lisaks oli katses *P. putida* PaW85 tüvi, milles oli korraga deleteeritud nii *rluA* kui ka *truA* ($\Delta rluA\Delta truA$).



Joonis 10. Spontaansete Rif^R mutantide tekkesagedus *P. putida* PaW85 algtüve (*wt*), $\Delta rluA$, $\Delta truA$ ja $\Delta rluA\Delta truA$ deletsioonitüvede eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudes 30 °C juures. Joonisel on näidatud kolme sõltumatu katse tulemuste ($\Delta truA$ puhul kahe sõltumatu katse) keskväärtsused, koos 95% usalduspiiridega. Deletsioonitüvesid on võrreldud *wt* tulemusega, kasutades Studenti T-testi. * tähistab p-väärtust <0,01.

Joonisel 10, on näha, et $\Delta rluA$ mutatsioonisagedus on keskmiselt kuus korda kõrgem kui *wt*-il. Antud erinevus on ka statistiliselt oluline. $\Delta rluA$ ja $\Delta truA$ tüvede mutatsioonisagedused on võrreldavad. $\Delta rluA\Delta truA$ tüve mutatsioonisagedusel ei esinenud kumulatiivset efekti. Tulemuste põhjal saame järeldada, et RluA puudumine suurendab mutatsioonisagedust *P. putida* rakkudes eksponentsiaalses kasvufaasis.

Rif^R/*rpoB* testsüsteemiga detekteerime DNA mutatsioone. Pseudouridiinid sünteesitakse RNA-sse ning seetõttu avaldub nende mõju translatsioonil (Harrington jt., 1993). Seetõttu paistab esmapilgul üllatavana, et modifikatsiooni puudumine RNA-s võib viia mutatsioonideni DNA-s. Potentsiaalselt võib 32. positsioonis asuv Ψ hoida tRNA ASL struktuuri stabiilsena. Kuna on nähtud, et selline stabiilsus *E. coli* tRNA-s võib suurendada translatsioonitäpsust

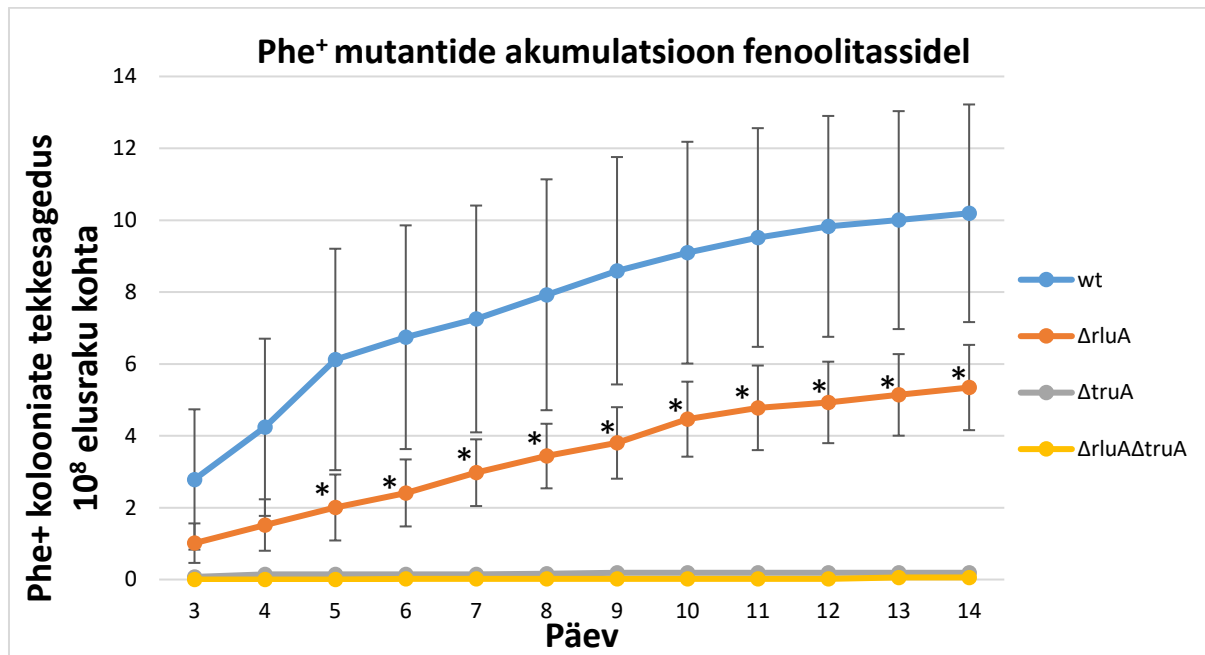
(Harrington jt., 1993), siis võib teoreetiliselt ka 32. Ψ puudumisel olla translatsioon tavalisest ebatäpsem. Ebatäpse translatsiooni tõttu võidakse peptiidahelasse lisada valesid aminohappeid. Vead valkude aminohappelises järjestuses võivad rikkuda nende funktsionaalsuse. RluA modifitseerib *E. coli*s nelja tRNA-d (tRNA^{Phe}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Leu4} ja tRNA^{Leu6}) ja mõjutab seeläbi kolme aminohapet (Raychaudhuri jt., 1999). Vead nende kolme aminohappe lisamisel peptiidahelasse, võivad olla piisavad suure hulga vigaste valkude tekkeks. Valesti sünteesitud valkude hulgas saavad olla näiteks DNA polümeraasid, mis võivad omakorda teha vigu replikatsioonil. Kui aga näiteks on valesti sünteesitud DNA reparatsioonivalgud, ei pruugi need korrektselt replikatsioonil tekkinud vigu parandada. Selline sündmustejada võib selgitada, miks näeme rakkudes tRNA modifikatsioonide puudumisel mutatsioonisageduse tõusu.

Kuna TruA modifitseerib ainult tRNA-sid ning mutatsioonisageduse tõusu eksponentsiaalses kasvufaasis on näha nii $\Delta rluA$ kui ka $\Delta truA$ tüvel, siis saab oletada, et mutatsioonisageduse tõus tuleneb eelkõige puuduvatest modifikatsioonidest tRNA-des. RluA ja TruA puudumisest tingitud efektide võrdlemisel tuleb siiski arvestada tõsiasjaga, et RluA modifitseerib ka rRNA-d. *E. coli* ribosoomi RNA-s on näidatud, et pseudouridiinide olemasolul on koodon-antikoodon paardumine korrektsem, mis omakorda suurendab translatsioonitäpsust (Lane jt., 1995, Ofengand jt., 1995). Seetõttu ei saa välistada, et RluA puudumisel nähtud kuuekordne mutatsioonisageduse tõus võib tingitud olla pseudouridiinide puudumisest mõlemas RNA molekulis.

2.3.3 RluA mõju *P. putida* statsionaarse kasvufaasi rakkude mutatsioonisagedusele

Lisaks eksponentsiaalse kasvufaasi mutatsioonisagedusele vaatasime kas RluA mõjutab mutatsioonide toimumist ka statsionaarses faasis. Selleks kasutasime plasmiidset testsüsteemi pKTPheA22TAG (Tegova jt., 2004), millega mõõtsime spontaansete asendusmutatsioonide teket nälgivates *P. putida* rakkudes. Selles testsüsteemis on plasmidi pKT240 viidud fenooli monooksügenaasi kodeeriv geen *pheA*, mille 22. koodon (Leu) on asendatud enneagse stoppkoodoniga TAG. *pheA* geen kodeerib fenooli monooksügenaasi, mille avaldumine võimaldab rakkudel kasutada fenooli süsinikuallikana. Plaatides rakud fenool-minimaalsöötmel, milles ainsaks süsinikuallikaks on fenool, on fenoolil kasvavate (Phe⁺) kolooniate tekkimiseks vaja, et toimuks asendusmutatsioon enneagses stoppkoodonis. Juhul kui pseudouridiini süntaasi geeni puudumisel suureneb rakus mutatsioonisagedus, siis suureneb ka asendusmutatsioonide hulk 22. koodonis ja fenooli söötmel on näha rohkem akumulerevaid

Phe⁺ kolooniaid kui *wt* tüvel. Katses võrldesime $\Delta rluA$, $\Delta truA$ ja $\Delta rluA\Delta truA$ akumul eeruvate Phe⁺ kolooniate tekkesagedusi alg tüve omaga.



Joonis 11. Spontaansete asendusmutatsioonide tekkesagedus *P. putida* PaW85 alg tüve (*wt*), $\Delta rluA$ $\Delta truA$ ja $\Delta rluA\Delta truA$ deletsioonitüvede statsionaarse faasi rakkudes 30 °C juures. Joonisel on 3.-14. päeval tekkinud Phe⁺ kolooniate keskmine tekkesagedus 1 x 10⁸ elusraku kohta. Igal järgneval päeval tekkinud kolooniate arv on liidetud eelneva päeva arvule, seega 14-nda katsepäeva kolooniate tekkesagedus esindab kogu katseperioodil tekkinud kolooniate tekkesagedust. Joonisel on toodud kahe sõltumatu katse tulemused, koos 95% usalduspiiridega. $\Delta rluA$ tulemusi on võrreldud *wt* tulemustega, kasutades Studenti T-testi. * tähistab p-väärtust <0,01.

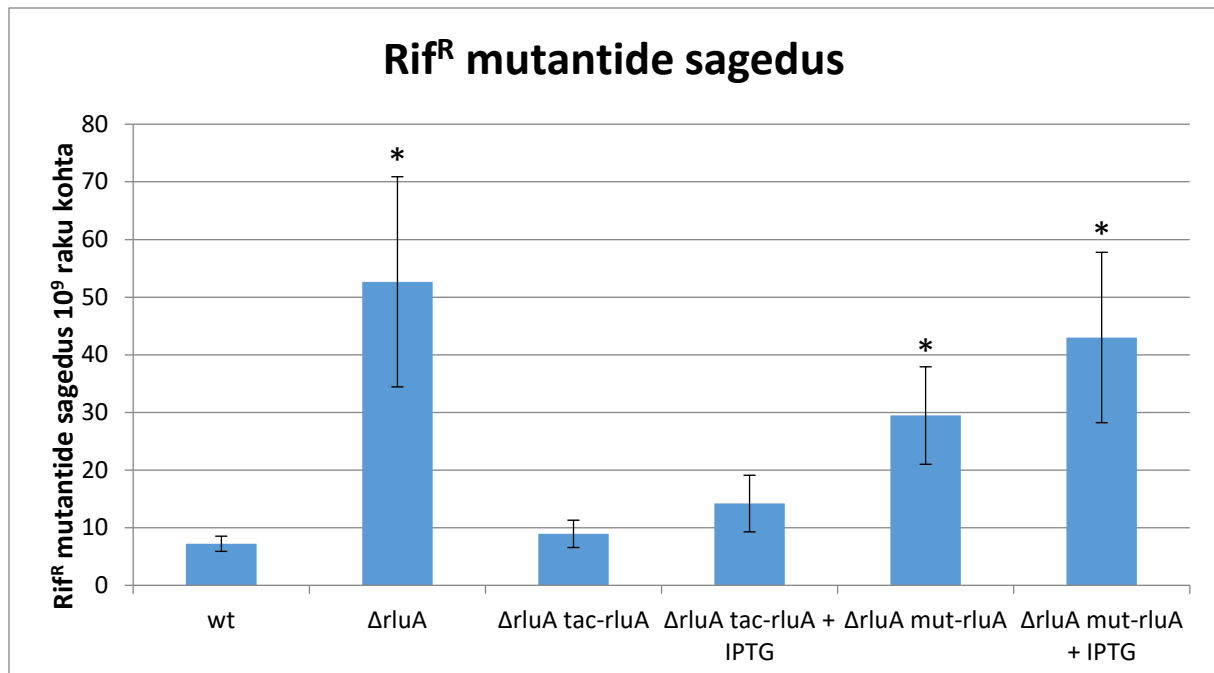
Jooniselt 11, on näha, et $\Delta rluA$ mutatsioonisagedus on ligi kaks korda madalam *wt* tüvest. Lisaks on näha, et tüvedel, millel puudub *truA*, kolooniaid ei teki. Antud tulemus on vastupidine eksponentsiaalses kasvufaasis nähtuga (joonis 10). Eksponentsiaalses kasvufaasis toimub aktiivne rakkude paljunemine ning seetõttu ka RNA-de ning valkude süntees. Järelikult toimub ka RNA modifitseerimine eelkõige eksponentsiaalses kasvufaasis. See võib seletada, miks *RluA* olemasolu on rakkudele olulisem just eksponentsiaalses ja mitte statsionaarses kasvufaasis. Kolmanda päeva Phe⁺ kolooniad tekivad enamasti tänu eksponentsiaalses kasvufaasis toimunud mutatsioonidele. Seetõttu peaks kolmanda päeva Phe⁺ kolooniate tekkesagedus olema *wt* ja $\Delta rluA$ tüvedel võrreldav (Tegova jt., 2004). Kui vaadata jooniselt 11 Phe⁺ kolooniate tekkesagedust kolmandal päeval, siis on näha, et statistiliselt olulist erinevust kolooniate tekkesagedusel tõesti ei ole, kuid $\Delta rluA$ tüvedel oli katses peaaegu kõigil paralleelidel alati vähem kolooniaid kui *wt* tüvedel.

Lisaks tuleb arvestada, et Rif^R/*rpoB* ja pKTpheA22TAG testsüsteeme ei saa omavahel täpselt võrrelda, sest esimene põhineb geenil, mis asub ühes koopias kromosoomis ja teine on plasmiidne testsüsteem. Nagu näha jooniselt 11, siis *P. putida* wt tüvedes, kus on deleteeritud *truA*, on kolooniate tekkesagedus nullilähedane. Seda on ka varasemalt meie laboris *P. putida* Δ *truA* rakkude puhul näidatud (Tagel jt., 2016).

2.3.4 *P. putida* Δ *rluA* *tac-rluA* komplementatsioonitüvi ja RluA aktiivtsentri mutant

Selleks, et vaadata, kas eelnevalt kirjeldatud mutatsioonisageduse tulemused on tingitud just *rluA* geeni puudumisest, komplementeeriti meie laboris *P. putida* PaW85 Δ *rluA* tüve LacI repressori ja *tac* promootori kontrolli all oleva *rluA* geeniga (*P. putida* PaW85 Δ *rluA* *tac-rluA*). Selleks kloneeriti lacI*tac-rluA* ekspressioonikassett minitransposoon Tn7 koosseisu ning viidi *P. putida* PaW85 Δ *rluA* tüve kromosoomi *glmS* geenile järgnevasse mittekodeerivasse DNA järjestusesse. Lac repressori kontrolli all oleva *tac* promootori indutseerimiseks ja *rluA* ekspresseerimiseks kasutasime IPTG-d. Sellega saame kontrollida, kas mutatsioonisageduse muutus rakkudes tulenes tõepoolest *rluA* puudumisest. Lisaks komplementeeriti *P. putida* PaW85 Δ *rluA* tüvi LacI repressori ja *tac* promootori kontrolli all oleva *rluA* geeniga, millel oli mutantne aktiivtsenter. Selleks oli sisseviidava *rluA* geeni järjestuses katalüütiline aspargiinhappejääk asendatudalaniiniga. Sellise tüve abil saame kontrollida, kas RluA katalüütiline aktiivsus *P. putidas* tuleneb just katalüütilisest aspargiinhappejäägist.

Joonisel 12 on näha, et *rluA* tagasiviimisel deletsioonitüvesse, taastub wt fenotüüp. Sellest võime järeldada, et mutatsioonisageduse tõus tulenes just *rluA* puudumisest. Mutantse aktiivtsentriga Δ *rluA* mut-*rluA* tüvel, millel oli tagasiviidavas *rluA* geenis aspargiinhappejääk asendatudalaniiniga, sarnaneb fenotüüp Δ *rluA*-le. Kuna *rluA* geenis aspargiinhappejäägi asendaminealaniiniga tõstab Rif^R mutantide tekkesagedust, siis saame järeldada, et mutatsioonisageduse tõus *P. putida* rakkudes tuleneb RluA katalüütilise aspargiinhappejäägi olemasolust.



Joonis 12. Spontaansete Rif^R mutantide tekkesagedus *P. putida* Paw85 algtüve (*wt*), $\Delta rluA$, $\Delta rluA$ *tac-rluA* ja $\Delta rluA$ *mut-rluA* tüvede eksponentsiaalse kasvufaasis rakkudes 30 °C juures. Komplementatsioonitüvesid on kasvatatud IPTG-ga ning ilma. Joonisel on toodud kolme sõltumatu katse tulemuste keskvaartused koos 95% usalduspiiridega. Konstrueeritud tüvesid on võrreldud *wt* tulemusega, kasutades Studenti T-testi. * tähistab p-väärtust <0,01.

Komplementatsioonitüved, mida pole indutseeritud IPTG-ga on võrreldavad nendega, millel indutseerimine on toimunud. See nähtus tuleneb *tac* promootori läbilaskvusest. See, et *tac-rluA* tüvel on näha algse fenotüübi taastumist IPTG-d lisamata näitab, et rakkudes on eksponentsiaalses kasvufaasis RluA-d vaja väikeses koguses.

2.3.5 RluA puudumise mõju *P. putida* rakkude kasvukiirusele

Kuna varasemalt on *E. coli*s näidatud, et *rluA* puudumine ei mõjuta rakkude kasvukiirust (Raychaudhuri jt., 1999), tahtsime teada, kas nii on ka *P. putida*s. Kasvukiirust mõõtsime nii *P. putida* PaW85 *wt*, $\Delta rluA$, $\Delta truA$, $\Delta rluA \Delta truA$, $\Delta rluA$ *tac-rluA* kui ka $\Delta rluA$ *mut-rluA* rakkudes. Kasvukiiruse leidmiseks, mõõtsime tüvede optilise tiheduse muutust ajas. Seejärel arvutasime kõigile tüvedele generatsiooniajad kasvukõveralt eksponentsiaalsest kasvufaasist (tabel 1).

Tabel 1. *P. putida* Paw85 (*wt*), $\Delta rluA$, $\Delta truA$, $\Delta rluA\Delta truA$, $\Delta rluA\ tac-rluA$ ning $\Delta rluA\ mut-rluA$ generatsiooniaeg glc CAA vedelsöötmes. Rakud on kasvanud 12 tundi glc CAA vedelsöötmes, 30 °C juures.

Tüvi	<i>wt</i>	$\Delta rluA$	$\Delta truA$	$\Delta rluA\Delta truA$	$\Delta rluA\ tac-rluA$	$\Delta rluA\ mut-rluA$
Generatsiooniaeg ^a	68,2 (+/- 3,1)	69,8 (+/- 3,4)	56,3* (+/- 2,5)	54,1* (+/- 2,9)	66,6 (+/- 3,3)	69,1 (+/- 3,0)

^a Generatsiooniaeg on esitatud minutites. Sulgudes on märgitud 95% usalduspiirid.

* p-väärtus <0,01. Konstrueeritud tüvesid on võrreldud *wt* tüvega Studenti T-testiga.

Tabelist 1 on näha, et *P. putida* $\Delta rluA$ generatsiooniaeg ei erine *wt* rakkude omast. Samuti on $\Delta rluA\ tac-rluA$ ja $\Delta rluA\ mut-rluA$ komplementatsioonitüvede generatsiooniajad võrreldavad *wt* omaga. See tulemus kattub *E. colis* nähtuga (Raychaudhuri jt., 1999). Kasvukiirus on madalam $\Delta truA$ tüvedel. TruA sünteesib pseudouridiinid tRNA-s ASL piirkonnas 38.-40. positsiooni uridiinidest. RluA modifitseerib ASL piirkonnas vaid ühte nukleotiidi ning lisaks veel ühte rRNA-s. Kirjanduses on näidatud, et kui *S. typhimurium*il on tRNA-s 37. positsiooni adeniin hüpermodifitseerimata, väheneb rakkude kasvukiirus (Ericson ja Björk, 1986). 37. adeniin asub tRNA antikoodoni vahetus läheduses. Katsetest *S. typhimurium*iga selgus, et modifikatsioonita rakkudel vähenes translatsiooniefektiivsus, mistõttu translatsioon aeglustus. Aeglustumine paistis olevat seotud rakkude kasvukiiruse vähenemisega. Kuna TruA sünteesitud pseudouridiinid asuvad tRNA ASL-is väga sarnases positsioonis *S. typhimuriumi* hüpermodifitseeritud adeniinile ning hoiavad *E. colis* samuti translatsiooniefektiivsuse taset (Hur ja Stroud, 2007), võiks spekuloida, et pseudouridiinide puudumine sealsetes positsioonides vähendab rakkude kasvukiirust samuti läbi translatsioonikiiruse vähenemise.

Kokkuvõte

Mutatsioonide teke annab aluse bakterite evolutsioneerumisele. Mutatsioonisageduse tõusuga on otseselt seotud mitmed geenid, mille seas on hiljuti avastatud ka RNA-d modifikatseerivate ensüümide omi. Pseudouridiinid on kõige laiemalt levinud RNA modifikatsioonid. Pseuduridiinidel on leitud seos rakkude translatsioonitäpsuse ja efektiivsusega, kasvukiirusega ning mutatsioonisagedusega. Bakterites sünteesivad pseudouridiine spetsiaalsed ensüümid, pseudouridiini süntaasid. Pseudouridiini süntaaside katalüütilise aktiivsuse tagab nende aktiivtsentris asuv aspargiinhappejääk.

Meie laboris uuritakse mutatsiooniprotsesse bakteris *Pseudomonas putida*. Varasemalt on meie uurimisgrupis leitud, et pseudouridiini süntaasi TruA sünteesitavad pseudouridiinid on seotud *Pseudomonas putida* rakkude mutatsioonisagedusega. TruA sünteesib pseudouridiine tRNA antikoodoni lähedusse positsioonidesse 38-40. Sarnasesse piirkonda 32. positsiooni sünteesib pseudouridiine veel üks pseudouridiini süntaas nimega RluA. Sellest lähtuvalt otsustasime uurida, kuidas pseudouridiini süntaasi RluA deleteerimine mõjub rakkude mutatsioonisagedusele.

Käesoleva töö käigus näitasime järgnevat:

1. RluA puudumine tõstab mutatsioonisagedust *Pseudomonas putida* rakkudes eksponentsiaalses kasvufaasis ligi kuus korda.
2. RluA puudumine alandab mutatsioonisagedust *Pseudomonas putida* rakkudes statsionaarses kasvufaasis ligi kaks korda.
3. RluA puudumisel nähtud fenotüüp *Pseudomonas putida* rakkudes tuleneb pseudouridiini süntaasi katalüütilisest aspargiinhappejäägist.
4. RluA puudumine ei mõjuta *P. putida* bakterirakkude kasvukiirust.

Pseudouridine synthase RluA of *Pseudomonas putida*

Aneth Lvovs

Summary

Mutations are a key factor for evolution in bacteria. Increase in the mutation rate causes more mutations to happen and therefore speeds the evolutionary process. There have been a number of genes linked to the increase of mutation rates in bacteria. Among those are genes that are responsible for RNA modifications. The most abundant RNA modifications are pseudouridines. Some pseudouridines have shown to increase the rate and fidelity of translation and there are also those that have an effect on the growth rate of bacteria. Some pseudouridines that locate near the anticodon regions of tRNAs have been associated with the increase of the mutation rate. In bacterial cells pseudouridines are synthesised by special enzymes called pseudouridine synthases. For pseudouridine synthases the most essential part for the catalytic activity is the aspartate in the active center of the protein.

In our workgroup, we study mutational processes in *Pseudomonas putida* cells. It has been previously shown in our workgroup that cells lacking the pseudouridine synthase TruA, have an increased mutation rate. TruA synthesises pseudouridines near the anticodon region of tRNAs. There is another pseudouridine synthase called RluA, that also synthesises pseudouridines near the anticodon. Therefore we decided to find out if the pseudouridine synthase RluA is also connected to the mutation rate of *Pseudomonas putida* cells.

During our research we have found that:

1. *Pseudomonas putida* cells lacking RluA have a 6-fold rise in the mutation rate during exponential growth.
2. *Pseudomonas putida* cells lacking RluA have 2-fold decrease in the mutation rate during stationary growth.
3. Phenotypes seen in RluA deficiency in *Pseudomonas putida* originates from the catalytic aspartic acid in the active centre of the protein.
4. RluA does not effect the growth rate of *Pseudomonas putida* cells.

Tänu sõnad

Soovin tänada oma juhendajat Marit sõbralikkuse, toetuse ja kannatlikkuse eest ning samuti minu juhendamise ja motiveerimise eest antud töö valmimisel. Tahaksin tänada veel Heilit, kes mind töö valmimisel samuti palju aitas. Aitäh ka teistele laborikaaslastele laboris hea meeleolu hoidmise eest.

Kasutatud kirjandus

Addepalli, B. & P. A. Limbach (2016). "Pseudouridine in the Anticodon of *Escherichia coli* tRNA^{Tyr} (QΨA) Is Catalyzed by the Dual Specificity Enzyme RluF." Journal of Biological Chemistry **291**(42): 22327-22337.

Arnez, J. G. & T. A. Steitz (1994). "Crystal structure of unmodified tRNA^{Gln} complexed with glutamyl-tRNA synthetase and ATP suggests a possible role for pseudo-uridines in stabilization of RNA structure." Biochemistry **33**(24): 7560-7567.

Bayley, S. A., C. J. Duggleby, M. J. Worsey, P. A. Williams, K. G. Hardy & P. Broda (1977). "Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2." Molecular and General Genetics MGG **154**(2): 203-204.

Björk, G. R. & T. G. Hagervall (2014). "Transfer RNA modification: presence, synthesis, and function." EcoSal Plus **6**(1).

Björk, G. R., P. M. Wikstrom & A. S. Bystrom (1989). "Prevention of translational frameshifting by the modified nucleoside 1-methylguanosine." Science **244**(4907): 986-990.

Brimacombe, R., P. Mitchell, M. Osswald, K. Stade & D. Bochkariov (1993). "Clustering of modified nucleotides at the functional center of bacterial ribosomal RNA." The FASEB Journal **7**(1): 161-167.

Bykhovskaya, Y., K. Casas, E. Mengesha, A. Inbal & N. Fischel-Ghodsian (2004). "Missense mutation in pseudouridine synthase 1 (PUS1) causes mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA)." The American Journal of Human Genetics **74**(6): 1303-1308.

Charette, M. & M. W. Gray (2000). "Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why." IUBMB life **49**(5): 341-351.

Cohn, W. (1957). Minor constituents of ribonucleic acids. Federation proceedings, Federation amer soc exp biol 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3998.

Conrad, J., L. Niu, K. Rudd, B. G. Lane & J. Ofengand (1999). "16S ribosomal RNA pseudouridine synthase RsuA of *Escherichia coli*: deletion, mutation of the conserved Asp102 residue, and sequence comparison among all other pseudouridine synthases." RNA **5**(6): 751-763.

Conrad, J., D. Sun, N. Englund & J. Ofengand (1998). "The *rluC* gene of *Escherichia coli* codes for a pseudouridine synthase that is solely responsible for synthesis of pseudouridine at positions 955, 2504, and 2580 in 23 S ribosomal RNA." Journal of Biological Chemistry **273**(29): 18562-18566.

Davis, D. R. (1995). "Stabilization of RNA stacking by pseudouridine." Nucleic acids research **23**(24): 5020-5026.

Davis, D. R., C. A. Veltri & L. Nielsen (1998). "An RNA model system for investigation of pseudouridine stabilization of the codon-anticodon interaction in tRNA^{Lys}, tRNA^{His} and tRNA^{Tyr}." Journal of Biomolecular Structure and Dynamics **15**(6): 1121-1132.

Davis, F. F. & F. W. Allen (1957). "Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide." Journal of Biological Chemistry **227**(2): 907-915.

Decatur, W. A. & M. J. Fournier (2002). "rRNA modifications and ribosome function." Trends in biochemical sciences **27**(7): 344-351.

Del Campo, M., J. Ofengand & A. Malhotra (2004). "Crystal structure of the catalytic domain of RluD, the only rRNA pseudouridine synthase required for normal growth of *Escherichia coli*." RNA **10**(2): 231-239.

Ericson, J. U. & G. Björk (1986). "Pleiotropic effects induced by modification deficiency next to the anticodon of tRNA from *Salmonella typhimurium* LT2." Journal of bacteriology **166**(3): 1013-1021.

Fleissner, E. & E. Borek (1962). "A new enzyme of RNA synthesis: RNA methylase." Proceedings of the National Academy of Sciences **48**(7): 1199-1203.

Frey, B., J. McCloskey, W. Kersten & H. Kersten (1988). "New function of vitamin B12: cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." Journal of bacteriology **170**(5): 2078-2082.

Hall, K. B., J. R. Sampson, O. C. Uhlenbeck & A. G. Redfield (1989). "Structure of an unmodified tRNA molecule." Biochemistry **28**(14): 5794-5801.

Hamma, T. & A. R. Ferré-D'Amaré (2006). "Pseudouridine synthases." Chemistry & biology **13**(11): 1125-1135.

Harrington, K. M., I. A. Nazarenko, D. B. Dix, R. C. Thompson & O. C. Uhlenbeck (1993). "*In vitro* analysis of translational rate and accuracy with an unmodified tRNA." Biochemistry **32**(30): 7617-7622.

Hoang, C., J. Chen, C. A. Vizthum, J. M. Kandel, C. S. Hamilton, E. G. Mueller & A. R. Ferré-D'Amaré (2006). "Crystal structure of pseudouridine synthase RluA: indirect sequence readout through protein-induced RNA structure." Molecular cell **24**(4): 535-545.

Hoang, C. & A. R. Ferré-D'Amaré (2001). "Cocrystal structure of a tRNA Ψ 55 pseudouridine synthase: nucleotide flipping by an RNA-modifying enzyme." Cell **107**(7): 929-939.

Hur, S. & R. M. Stroud (2007). "How U38, 39, and 40 of many tRNAs become the targets for pseudouridylation by TruA." Molecular cell **26**(2): 189-203.

Iwata-Reuyl, D. (2003). "Biosynthesis of the 7-deazaguanosine hypermodified nucleosides of transfer RNA." Bioorganic chemistry **31**(1): 24-43.

Iwata-Reuyl, D. (2008). "An embarrassment of riches: the enzymology of RNA modification." Current opinion in chemical biology **12**(2): 126-133.

Jatsenko, T., A. Tover, R. Tegova & M. Kivisaar (2010). "Molecular characterization of Rif^r mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*." Mutation Research **683**(1): 106-114.

Johnson, L. & D. Söll (1970). "In vitro biosynthesis of pseudouridine at the polynucleotide level by an enzyme extract from *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences **67**(2): 943-950.

Kammen, H. O., C. C. Marvel, L. Hardy & E. E. Penhoet (1988). "Purification, structure, and properties of *Escherichia coli* tRNA pseudouridine synthase I." Journal of Biological Chemistry **263**(5): 2255-2263.

Krzyzosiak, W., R. Denman, K. Nurse, W. Hellmann, M. Boublik, C. Gehrke, P. Agris & J. Ofengand (1987). "In vitro synthesis of 16S ribosomal RNA containing single base changes and assembly into a functional 30S ribosome." Biochemistry **26**(8): 2353-2364.

Lane, B., J. Ofengand & M. Gray (1995). "Pseudouridine and O²-methylated nucleosides. Significance of their selective occurrence in rRNA domains that function in ribosome-catalyzed synthesis of the peptide bonds in proteins." Biochimie **77**(1-2): 7-15.

Li, S. & C. E. Mason (2014). "The pivotal regulatory landscape of RNA modifications." Annual review of genomics and human genetics **15**: 127-150.

Lowe, T. M. & P. P. Chan (2016). "tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes." Nucleic acids research **44**(W1): W54-W57.

Maas, S. & A. Rich (2000). "Changing genetic information through RNA editing." Bioessays **22**(9): 790-802.

Machnicka, M. A., K. Milanowska, O. O. Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz & K. M. Rother (2012). "MODOMICS: a database of RNA modification pathways—2012 update." Nucleic acids research: gks1007.

Martínez-García, E., B. Calles, M. Arévalo-Rodríguez & V. de Lorenzo (2011). "pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes." BMC microbiology **11**(1): 38.

Miller, J. H. (1992). "A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria." Biochimie **75**(6): 456.

Ofengand, J., A. Bakin, J. Wrzesinski, K. Nurse & B. G. Lane (1995). "The pseudouridine residues of ribosomal RNA." Biochemistry and cell biology **73**(11-12): 915-924.

Pósfai, G., V. Kolisnychenko, Z. Bereczki & F. R. Blattner (1999). "Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome." Nucleic acids research **27**(22): 4409-4415.

Raychaudhuri, S., J. Conrad, B. G. Hall & J. Ofengand (1998). "A pseudouridine synthase required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of *Escherichia coli*." RNA **4**(11): 1407-1417.

Raychaudhuri, S., L. Niu, J. Conrad, B. G. Lane & J. Ofengand (1999). "Functional Effect of Deletion and Mutation of the *Escherichia coli* Ribosomal RNA and tRNA Pseudouridine Synthase RluA." Journal of Biological Chemistry **274**(27): 18880-18886.

Sampson, J. R. & O. C. Uhlenbeck (1988). "Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed *in vitro*." Proceedings of the National Academy of Sciences **85**(4): 1033-1037.

Sivaraman, J., V. Sauvé, R. Larocque, E. A. Stura, J. D. Schrag, M. Cygler & A. Matte (2002). "Structure of the 16S rRNA pseudouridine synthase RsuA bound to uracil and UMP." Nature Structural & Molecular Biology **9**(5): 353-358.

Sood, A. J., C. Viner & M. M. Hoffman (2016). "DNAMod: the DNA modification database." bioRxiv: 071712.

Spedaliere, C. J. & E. G. Mueller (2004). "Not all pseudouridine synthases are potently inhibited by RNA containing 5-fluorouridine." RNA **10**(2): 192-199.

Sun, W.-J., J.-H. Li, S. Liu, J. Wu, H. Zhou, L.-H. Qu & J.-H. Yang (2015). "RMBase: a resource for decoding the landscape of RNA modifications from high-throughput sequencing data." Nucleic acids research: gkv1036.

Svensson, I., H. G. Boman, K. G. Eriksson & K. Kjellin (1963). "Studies on microbial RNA: I. Transfer of methyl groups from methionine to soluble RNA from *Escherichia coli*." Journal of molecular biology **7**(3): 254-271.

Zhao, J., H.-C. E. Leung & M. E. Winkler (2001). "The *miaA* Mutator Phenotype of *Escherichia coli* K-12 Requires Recombination Functions." Journal of bacteriology **183**(5): 1796-1800.

Tagel, M., K. Tavita, R. Hörak, M. Kivisaar & H. Ilves (2016). "A novel papillation assay for the identification of genes affecting mutation rate in *Pseudomonas putida* and other pseudomonads." Mutation Research **790**: 41-55.

Tegova, R., A. Tover, K. Tarassova, M. Tark & M. Kivisaar (2004). "Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*." Journal of bacteriology **186**(9): 2735-2744.

Tsui, H., P. Arps, D. Connolly & M. Winkler (1991). "Absence of *hisT*-mediated tRNA pseudouridylation results in a uracil requirement that interferes with *Escherichia coli* K-12 cell division." Journal of bacteriology **173**(22): 7395-7400.

Wong, S. M. & J. J. Mekalanos (2000). "Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(18): 10191-10196.

Wrzesinski, J., K. Nurse, A. Bakin, B. Lane & J. Ofengand (1995). "A dual-specificity pseudouridine synthase: an *Escherichia coli* synthase purified and cloned on the basis of its specificity for psi 746 in 23S RNA is also specific for psi 32 in tRNA (phe)." RNA **1**(4): 437-448.

Yokobori, S.-i., T. Suzuki & K. Watanabe (2001). "Genetic code variations in mitochondria: tRNA as a major determinant of genetic code plasticity." Journal of Molecular Evolution **53**(4): 314-326.

Kasutatud veebiaadressid

<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Aneth Lvovs (18.07.1995),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„*Pseudomonas putida* pseudouridiini süntaas RluA” mille

juhendajateks on Mari Tagel, MSc ja Heili Ilves, PhD

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas

digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja

lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas

digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega

isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.17